



Elaboration de revêtements pour matériaux de construction visant à lutter contre la prolifération microbienne à l'intérieur des bâtiments : efficacité et mode d'action

Thomas Verdier

► To cite this version:

Thomas Verdier. Elaboration de revêtements pour matériaux de construction visant à lutter contre la prolifération microbienne à l'intérieur des bâtiments : efficacité et mode d'action. Matériaux composites et construction. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30191 . tel-01332618

HAL Id: tel-01332618

<https://theses.hal.science/tel-01332618>

Submitted on 16 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Présentée et soutenue le 25/11/2015 par :

THOMAS VERDIER

Élaboration de revêtements pour matériaux de construction visant à lutter contre la prolifération microbienne à l'intérieur des bâtiments : efficacité et mode d'action

JURY

MARIE-NOËLLE	Professeur à AgroParisTech	Rapporteuse
BELLON-FONTAINE		
PHILIPPE GROSSEAU	Professeur à l'ENSM Saint-Étienne	Rapporteur
VIRGINIE WIKTOR	Ingénieur de recherche, TU Delft	Examinatrice
GILLES ESCADEILLAS	Professeur à l'Université Toulouse 3	Examineur
MARIE COUTAND	Maître de Conférences à l'IUT Toulouse 3	Membre invité
ALEXANDRA BERTRON	Professeur à l'INSA de Toulouse	Directrice de thèse
CHRISTINE ROQUES	Professeur à l'Université Toulouse 3	Co-encadrante

École doctorale et spécialité :

MEGEP : Génie civil

Unité de Recherche :

Laboratoire Matériaux et Durabilité des Constructions

Directrice de Thèse :

Alexandra Bertron

Rapporteurs :

Marie-Noëlle Bellon-Fontaine et Philippe Grosseau

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés de 2012 à 2015 au sein du Laboratoire Matériaux et Durabilité des Constructions (LMDC) de Toulouse et au sein du Laboratoire de Microbiologie Industrielle (LabMI, LGC, Dép. Biosym).

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse Alexandra Bertron, qui m'a encadré pendant ces trois années de thèse sur une thématique originale associant le Génie Civil et la Microbiologie. Je la remercie sincèrement pour ses nombreux conseils, ses remarques pertinentes et ses encouragements ainsi que pour sa confiance, qui m'a notamment permis d'être en autonomie pour la gestion de mes recherches. Je la remercie également pour son énergie sans limite et son enthousiasme qui m'ont aidé dans les moments de doute. Je tiens tout autant à remercier Marie Coutand, sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour et qui, aujourd'hui, s'est envolée vers de nouveaux horizons. Je la remercie particulièrement pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils avisés et ses encouragements tout au long de mes travaux, même à distance ! Je remercie également Christine Roques, qui m'a encadré sur le volet microbiologie de la thèse, pour ses réponses à mes nombreuses interrogations, pour ses remarques, ses conseils judicieux et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de découvrir la voie de la microbiologie (et je partais de loin...). Enfin, je les remercie toutes les trois pour leur relecture, leurs remarques et leurs corrections concernant mon manuscrit et ma présentation de thèse.

Je souhaite exprimer mes remerciements à Marie-Noëlle Bellon Fontaine et Phillipe Grosseau pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire de thèse ainsi que pour leurs remarques et critiques constructives. Je remercie aussi Virginie Wiktor pour avoir accepté d'être examinatrice lors de la soutenance. Je remercie également Gilles Escadeillas qui a accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens à remercier les équipes de la FONDEREPHAR et du LabMI, qui m'ont accueilli chaleureusement dans leurs locaux de la Faculté de Pharmacie de Toulouse et m'ont formé aux rudiments de la microbiologie, et particulièrement Catherine Feuillolay. Je la remercie pour sa disponibilité, son aide constante, ses nombreux conseils et son extrême gentillesse à mon égard. Je remercie également Cédric Panizzutti pour sa patience et ses conseils sur la mise en place de la norme JIS ainsi que Sophie Pécastaings et Julien Grimoud pour leur disponibilité également et leurs réponses à mes nombreuses interrogations, souvent bien naïves. Je souhaite par ailleurs remercier Geneviève Baziard pour ses conseils et son aide pour la mise en place des mesures d'angle de goutte. Je remercie également le reste des équipes pour leur aide quotidienne au cours de mes essais. Merci donc à Sylvie, Sandra, Céline, Aurélie, Haouaria, Jocelyne, Elisabeth, Laila, Alexis, Pricilla, Samantha, avec qui j'ai passé d'agréables pauses café !

Je tiens à exprimer mes remerciements à Christophe Roux (LRSV) pour sa disponibilité et pour son aide dans la mise en place d'essais de prolifération fongique. Et cela n'a pas été une mince affaire ! Merci Christophe. Je souhaite aussi remercier Benjamin Erable (LGC), avec qui j'ai également pris grand plaisir à collaborer, pour sa sympathie et pour son aide sur les observations au microscope à épifluorescence.

Je tiens à remercier Erick Ringot, notamment pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux de recherche, pour m'avoir permis un accès à LRVision lors de la formulation des lasures et pour ses conseils pertinents concernant les esters de glycérol.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des collègues de l'IUT Génie Civil qui m'ont accueilli avec beaucoup de gentillesse et avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler pendant mon monitorat et encore pendant mon année d'ATER !

Merci à tous les doctorants et collègues du LMDC avec qui j'ai partagé ces 3 années. Les pauses café, les repas, les barbecues, les soutenances de thèses... Merci pour tous ces moments de convivialité.

Merci aux anciens camarades de l'IUT : Elian, Laurent, Pierre-Marie, Valou, Bastien, merci d'être venus me soutenir le jour J, et merci aux autres (Mariette, Guillaume, William, Camille, Lucas). J'espère vous revoir encore pendant longtemps, ne serait-ce que pour une descente en trike ou pour construire une maison bioclimatique en terre crue !

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille, ma soeur Marjorie, mes frères Clément et Nathan, mes parents Corinne et Daniel, mes grands-parents Albert et Renée, et mes merveilleux beaux-parents, Pierre et Annie. Merci à vous d'avoir été présent ce jour-là. Merci d'avoir tout préparé, et avec tant d'attention, pour le pot de thèse. Sans vous cela aurait été beaucoup plus difficile. Merci d'être toujours là pour moi.

En dernier lieu, je tenais à remercier celle qui a vraiment fait tout le boulot. On imagine rarement ce que cela représente de faire une thèse, mais on oublie totalement les personnes essentielles. Celles qui sont en retrait mais toujours là, à nous soutenir, à nous porter, nous supporter, à nous aimer malgré tout et, finalement, à passer cette thèse avec nous. Les conjoints de thésards... Je finirai donc par remercier ma Lolo, à qui j'ai mené la vie dure, surtout dans les derniers mois. Un mot ne suffit pas. Un livre ne suffirait pas non plus. Merci amour.

Table des matières

Introduction Générale	9
1 Étude Bibliographique	15
1.1 Introduction	17
1.2 Prolifération microbienne sur matériaux de construction à l'intérieur des bâtiments	18
1.2.1 Généralités sur les micro-organismes	18
1.2.2 Contamination microbienne à l'intérieur des bâtiments	24
1.2.3 Méthodes d'investigation des surfaces	26
1.2.4 Campagnes de prélèvement <i>in situ</i>	36
1.2.5 Protocoles en laboratoire	39
1.2.6 Bio-réceptivité des matériaux - Facteurs déterminants	44
1.2.7 Conclusion	48
1.3 La photocatalyse comme solution pour la dépollution de l'air et des surfaces . . .	50
1.3.1 Généralités	50
1.3.2 La photocatalyse appliquée à la désinfection	58
1.3.3 Conclusion	64
1.4 Monoglycérides bio-sourcés	66
1.4.1 Généralités sur les esters de glycérol	66
1.4.2 Activité antimicrobienne des acides gras et de leurs esters	66
1.4.3 Mécanismes d'action	67
1.4.4 Résistance bactérienne	68
1.4.5 Conclusion	68
1.5 Conclusion de l'étude bibliographique	71
2 Matériaux et Méthodes	73
2.1 Introduction	75
2.2 Matériaux	76
2.2.1 Particules de dioxyde de titane	76
2.2.2 Lasures photocatalytiques	78
2.2.3 Matériaux supports	80
2.2.4 Ester de glycérol	81
2.3 Souches Bactériennes	81
2.4 Milieux de cultures et réactifs	82
2.4.1 Milieux de culture gélosé	82

2.4.2	Milieux liquides	83
2.5	Préparation des suspensions bactériennes et dénombrement	83
2.5.1	Préparation des suspensions d'essai	83
2.5.2	Dénombrement	84
2.5.3	Calculs	85
2.6	Évaluation de l'activité antibactérienne selon les normes JIS Z 2801 et ISO 27447	86
2.6.1	Paramètres d'essai	86
2.6.2	Validation de l'étape de neutralisation	89
2.6.3	Protocole expérimental	90
2.7	Évaluation de l'activité antibactérienne en suspension	91
2.7.1	Essai réalisé dans les conditions de la JIS Z 2801	91
2.7.2	Essais de bactéricidie selon la norme NF EN 1040	93
2.8	Résistance à la formation de biofilm	96
2.8.1	Configuration	96
2.8.2	Déroulement de l'essai	96
2.8.3	Microscopie à épifluorescence	97
2.8.4	Microscopie électronique à balayage	99
2.9	Évaluation de la prolifération microbienne par contamination naturelle	99
2.9.1	Mise en œuvre de l'essai	99
2.9.2	Analyse d'images	99
2.10	Évaluation du caractère superhydrophile de surface photo-induit	100
2.11	Conclusion	101
2.12	Annexe	102
2.12.1	Synthèse des essais mis en place et des matériaux testés	102
2.12.2	Protocole de coloration de Gram	102
3	Analyse de l'efficacité et des paramètres méthodologiques d'influence de l'activité antibactérienne photocatalytique	105
3.1	Introduction	106
3.2	Validation des protocoles de neutralisation et de récupération	107
3.3	Effet des particules photocatalytiques dans le noir	107
3.4	Évaluation de l'efficacité des particules photocatalytiques et effet du contact particules/bactéries	113
3.4.1	Premiers essais - 2h de contact	113
3.4.2	Méthode	115
3.4.3	Résultats	115
3.5	Influence de la nature du milieu : essai d'activité antibactérienne en suspension	118
3.5.1	Méthodes	119
3.5.2	Résultats	120
3.6	Conclusion	125

4 Développement et évaluation de l'efficacité et des modes d'action de revêtements antimicrobiens	127
4.1 Introduction	128
4.2 Lasures photocatalytiques	129
4.2.1 Étude du caractère superhydrophile photo-induit	129
4.2.2 Évaluation de l'activité anti-bactérienne	135
4.2.3 Évaluation de la formation de biofilm sur revêtement photocatalytique . .	145
4.2.4 Synthèse des résultats sur lasure photocatalytique	151
4.3 Produits bio-sourcés à base d'esters de glycérol	155
4.3.1 Propriétés antibactériennes	156
4.3.2 Prolifération par contamination "naturelle"	159
4.4 Conclusion	161
Conclusion et perspectives	163
Bibliographie	169
Table des figures	193
Liste des tableaux	197

Introduction Générale

La dégradation de la qualité de l'air intérieur est une question d'intérêt public depuis maintenant plusieurs années déjà. Différentes sources de polluants ont été identifiées et répertoriées par l'Organisation Mondiale de la Santé. Selon l'OMS, la pollution d'origine biologique, alliant essentiellement l'humidité et les micro-organismes, est l'une des principales. En effet, en conditions favorables, certains micro-organismes sont capables de relarguer de grandes quantités de particules, qui présentent un danger pour la santé humaine. Si aucune corrélation n'existe à ce jour entre la présence de micro-organismes et le degré de dangerosité pour les occupants, l'exposition à ces contaminants toxiques sur le long terme est bien associée à différents symptômes respiratoires et cutanés de type allergies, irritations, voire des infections superficielles et systémiques... La pollution de l'air intérieur entraîne des impacts économiques et sociaux importants. En 2015 en France, le Sénat a lancé une commission d'enquête sur le coût économique et financier de la pollution de l'air, incluant la pollution de l'air intérieur. Le rapport d'enquête fait notamment référence aux études de l'ANSES¹ et de l'OQAI², dans lesquelles le coût de la pollution de l'air intérieur a été estimé à 20 milliards d'euros par an. Sur le plan Européen, le poids total imputable à la dégradation de la qualité de l'air intérieur est estimé à 2 millions d'EVCI³ par an. À l'échelle mondiale, l'OMS rapporte qu'il s'agirait de 4,3 milliards de morts dues à la pollution de l'air intérieur.

De nombreuses études ont rapporté qu'en conditions favorables, les matériaux de construction pouvaient devenir la cible de contaminations microbiennes importantes. Les conditions d'humidité, de température et de nutrition optimales sont atteintes sans peine dans les bâtiments anciens, les bâtiments mal isolés, non étanches, mal ventilés et/ou ayant subi des dégâts des eaux. La prolifération sur les matériaux de construction constitue, dans ces conditions, une véritable source secondaire de contamination aérienne.

Depuis cette prise de conscience, des stratégies sont mises en place afin de limiter la prolifération et améliorer la qualité de l'air intérieur. Des recommandations pour des bonnes pratiques sont émises comme l'aération journalière des logements. Néanmoins, dans les zones urbaines, l'air extérieur est lui-même très chargé en polluants. Par ailleurs, aujourd'hui la tendance pour la construction des logements neufs ou la rénovation des bâtiments anciens est aux bâtiments basse consommation (BBC) : pour limiter les déperditions énergétiques, les bâtiments sont conçus pour

1. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

2. Observatoire de la qualité de l'air intérieur

3. Espérance de Vie Corrigée de l'Incapacité. Il s'agit d'une méthode d'évaluation de l'espérance de vie en bonne santé, exprimé comme le nombre d'années perdues en raison d'une mauvaise santé, d'un handicap ou d'un décès précoce.

présenter de très bonnes performances thermiques (isolation, étanchéité à l'eau, et à l'air). Pour compenser cela, des systèmes en dehors des systèmes de ventilation doivent être mis en œuvre pour assurer une qualité de l'air intérieur satisfaisante. Dans ce contexte, des dispositifs de purification de l'air intérieur sont déjà commercialisés, tels que des dispositifs de filtration de l'air (filtre HEPA), des dispositifs chimiques (ioniseurs...) etc. Ces solutions sont néanmoins parfois difficiles à mettre en œuvre dans des bâtiments existants, trop onéreuses, ou consommatrices d'une grande quantité d'énergie.

Dans ce contexte, la fonctionnalisation des matériaux de construction pour limiter, voire inhiber, la prolifération des micro-organismes à leur surface est une des solutions envisageables. L'idée générale de cette étude est de développer des dispositifs passifs de type revêtement, qui ne nécessitent pas d'apport d'énergie spécifique et qui sont capables de conférer aux matériaux de construction des propriétés antimicrobiennes. Deux technologies sont explorées dans ce travail :

- (i) la photocatalyse, dont le principe de fonctionnement repose sur l'irradiation d'un photocatalyseur par une source lumineuse pour engendrer des réactions d'oxydoréduction permettant de dégrader la matière organique à leur surface ou dans un proche environnement,
- (ii) l'utilisation de molécules bio-sourcées à chaînes carbonées, les monoglycérides, présentant des propriétés antimicrobiennes naturelles.

L'utilisation du procédé de photocatalyse pourrait être une réponse pertinente au problème de contamination microbienne des matériaux. Le principe repose sur l'excitation d'un semi-conducteur par une irradiation lumineuse. L'énergie reçue engendre la création de paires électrons-trous qui vont oxyder ou réduire les composés organiques adsorbés en surface du semi-conducteur. La plupart des semi-conducteurs sont généralement activés par un rayonnement de longueur d'onde située dans les ultra-violets mais des produits dopés sont développés selon différents procédés pour les rendre activables par un rayonnement visible. Dans tous les cas, le processus peut être utilisé comme un dispositif passif, activé par la lumière naturelle (solaire) ou par des lumières d'intérieur.

Cette technique présente, par définition, l'avantage de ne pas consommer le catalyseur pendant les réactions. Toutefois, la mise en œuvre du photocatalyseur est un paramètre fondamental de son efficacité. L'utilisation de particules de TiO_2 photocatalytique (TiO_2 sous sa forme anatase) est assez répandue : offrant une grande surface spécifique, elles ont montré des efficacités importantes mais elles nécessitent généralement des techniques spécifiques d'immobilisation sur support (membrane, réacteur, etc) dont certaines sont relativement complexes et coûteuses.

La photocatalyse a montré son efficacité sur une large variété de produits en phase aqueuse ou gazeuse, pour des applications aussi diverses que l'épuration de l'air (abattement des NO_x , NO , composés organiques volatils - COV - ...) ou le traitement des eaux usées (dégradation des effluents organiques, acides, aldéhydes, micro-organismes ...). Elle est en outre caractérisée par la non sélectivité des espèces dégradées mais les réactions de dégradation ont une efficacité variable en fonction des espèces considérées. La littérature sur la désinfection photocatalytique rapporte des taux de dégradation importants en conditions de laboratoire, où, afin de fournir un rendement maximal, le photocatalyseur (généralement du TiO_2) est disposé de façon à offrir la plus large surface active possible, sous une irradiance très élevée, dans des conditions bien

éloignées de celles que l'on retrouve en situation réelle dans un environnement intérieur. Les dispositifs mis en oeuvre, généralement des réacteurs, visent à épurer des flux d'air ou d'eau, par l'intermédiaire de petites surfaces actives et d'une lumière spécifique. Par ailleurs, ce type de dispositif n'exploite pas le potentiel de surface active que constitue les grandes surfaces intérieures comme les murs et les plafonds de nos bâtiments. Dans le domaine du Génie Civil, une solution est notamment développée depuis quelques années : les ciments photocatalytiques, qui incluent directement les particules de titane dans leur formulation. Ce sont des dispositifs moins coûteux, car ils ne nécessitent pas de processus particulier mais il faut en contrepartie accepter la perte d'une certaine quantité de catalyseur, qui se retrouve perdue dans la masse du matériau. Le développement de revêtements de surface présente a contrario l'avantage d'optimiser les quantités de photocatalyseurs accessibles. C'est notamment le cas des verres autonettoyants, ou de certaines peintures à base de TiO_2 .

Même si la solution photocatalyse est innovante et offre de nombreux avantages pour lutter contre la prolifération de micro-organismes, certaines limites peuvent être soulignées. En effet, en tant que matière première, le titane est fortement consommé par des secteurs comme l'aéronautique. Le dioxyde de titane est également très utilisé comme pigment pour sa couleur blanche dans l'industrie de la peinture, du papier, des plastiques... Le problème de la disponibilité de la ressource se posera à terme, d'autant plus que le développement de technologies et de filières de recyclage du titane n'en est qu'à ses balbutiements.

Par ailleurs, les rendements de la photocatalyse peuvent être limités en conditions réelles (notamment en fonction de la qualité de l'éclairage ou de la disponibilité des particules).

Il est également important de souligner l'aspect sanitaire, par la présence de nanoparticules qui, sous forme pulvérulente, peuvent être relarguées dans l'environnement.

Ainsi, nous avons également voulu explorer une alternative à la solution photocatalyse. L'utilisation de molécules bio-sourcées telles que les monoglycérides (ou monoesters de glycérol) comme agent de surface est également une méthode envisageable pour répondre à la problématique de contamination des matériaux de construction. Ce type de molécules, déjà utilisé dans l'industrie agroalimentaire comme agent émulsifiant, pourrait être directement appliqué sur les matériaux de construction pour leur conférer des propriétés antimicrobiennes.

Ainsi, les objectifs principaux de cette thèse étaient : (i) de développer des dispositifs passifs de type lasures, formulées à base de particules photocatalytiques de TiO_2 ou de monoglycérides, (ii) de quantifier la résistance à la prolifération microbienne offerte par ces revêtements dans des conditions réalistes de mise en œuvre et (iii) de contribuer à la compréhension des mécanismes d'action de ces revêtements.

Pour répondre à ces objectifs, une approche expérimentale a été adoptée afin de lever l'un des principaux verrous de ce travail, à savoir le développement des méthodologies d'évaluation microbiologiques pour ces revêtements particuliers. Différentes stratégies d'évaluation ont été mises en place au moyen d'expériences en batch. Il s'agit de mesures de l'activité antibactérienne et de la résistance à la formation de biofilms.

Le chapitre 1 présente un état de l'art sur la prolifération microbienne sur matériaux de construction en environnement intérieur. Cette étude bibliographique est centrée sur les sur-

faces des matériaux de construction colonisées par des micro-organismes. L'exposé présente les méthodes de prélèvements et d'analyses utilisées dans la littérature, ainsi que les différents micro-organismes identifiés le plus souvent sur différents types de matériaux. Les normes et dispositifs expérimentaux visant à l'évaluation de la prolifération microbienne sur les matériaux de construction sont également traités. Finalement, l'étude apporte une synthèse des différents facteurs déterminants pour la croissance microbienne sur matériau.

La suite du chapitre bibliographique présente les éléments nécessaires à la compréhension des phénomènes qui régissent la désinfection photocatalytique. Le principe général de la photocatalyse est d'abord présenté, puis l'application du procédé sur la dépollution d'origine biologique est détaillée. La dernière partie de la revue de littérature se concentre sur la présentation des esters de glycérol, molécules aux propriétés antimicrobiennes intéressantes, qui sont notamment utilisées dans l'industrie agro-alimentaire depuis plusieurs années.

Le chapitre 2 introduit les matériels et méthodes utilisés dans cette thèse pour l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des différents matériaux et de leur mécanismes d'action. Tout d'abord, les matériaux, les souches bactériennes et les milieux et réactifs utilisés au cours de cette étude sont présentés. Ensuite, les protocoles des différents essais menés pour l'évaluation des propriétés antimicrobiennes sont détaillés. Ils comprennent :

- l'évaluation de l'activité antibactérienne,
- l'évaluation du caractère super-hydrophile photo-induit,
- l'évaluation de la formation de biofilm,
- l'évaluation de la prolifération microbienne par contamination naturelle.

Concernant les méthodes mises en œuvre pour l'évaluation des propriétés antibactériennes de particules de TiO_2 seules, la stratégie d'évaluation est axée sur l'adaptation de méthodes standardisées permettant de déterminer l'activité antibactérienne de surfaces telles que des céramiques photocatalytiques.

Ne disposant pas du recul nécessaire pour s'assurer d'une efficacité suffisante avec les photocatalyseurs dopés et activables en visible (toujours objets de recherche et développement), et étant donné la difficulté expérimentale des essais mis en œuvre, des photocatalyseurs activables en UV, connus pour être efficaces, ont été utilisés. Néanmoins, afin de se rapprocher des conditions d'éclairement réalistes en environnement intérieur, une faible irradiance a été choisie pour activer les réactions photocatalytiques : 2, 5 à 5 W/m^2 .

Le chapitre 3 fait d'abord le point sur l'activité antibactérienne de particules de TiO_2 commerciales, sans activation photocatalytique par mise en contact avec une suspension bactérienne dans le noir. Les essais sont basés sur les normes concernant l'évaluation des surfaces antimicrobiennes (ISO 27447, 2009; JIS Z 2801, 2010). Par la suite, l'étude se concentre sur l'efficacité du TiO_2 activé par une source d'UV et détaille les différents facteurs méthodologiques qui influencent l'activité antibactérienne induite par photocatalyse sur *E. coli* (souche de référence indiquées dans les deux normes citées).

Le chapitre 4 expose les travaux réalisés pour l'évaluation des propriétés des revêtements. L'objectif principal est de développer et d'étudier l'efficacité des revêtements antimicrobiens pour matériaux de construction.

La première partie traite des lasures photocatalytiques. Il s'agit de (i) quantifier les propriétés antibactériennes des lasures, en relation avec certaines propriétés de surface et (ii) contribuer à la compréhension des mécanismes d'action de la photocatalyse sur les micro-organismes. La deuxième partie se concentre sur l'évaluation des monoglycérides bio-sourcés. L'objectif est ici de mener une série d'essais afin de cibler la gamme d'efficacité des molécules et d'observer leurs caractéristiques en tant que revêtement pour matériaux de construction.

L'évolution des angles de contact sur différents matériaux recouverts de lasure photocatalytique est abordée. Ces essais préliminaires renseignent sur le caractère hydrophile/hydrophobe des lasures, qui est un paramètre fondamental de l'adhésion des micro-organismes. Ensuite, l'activité antibactérienne est déterminée par une série d'essais selon la norme (JIS Z 2801). Enfin, il s'agit d'exploiter la méthodologie d'évaluation de la formation de biofilm, mise en place dans le chapitre 2. La stratégie d'évaluation repose sur deux méthodes d'analyse complémentaires : une méthode de dénombrement par culture et une méthode d'observation au microscope à épifluorescence. Des observations complémentaires au microscope électronique à balayage ont été réalisées afin de fournir des informations sur la morphologie du développement bactérien (organisation et aspect des cellules bactériennes, biofilm, etc.).

La dernière partie du chapitre 4 est consacrée à l'exploration des caractéristiques antimicrobiennes de monoglycérides (MG). Trois types d'essais sont mis en place afin de déterminer : (a) le potentiel bactéricide en suspension (NF EN 1040, 2006), (b) l'activité antibactérienne en tant que support (JIS Z 2801, 2010) et (c) la résistance à la prolifération par contamination naturelle sur matériaux de construction.

Le mémoire s'achève par une conclusion générale dressant un bilan du travail mené et des perspectives qui en résultent.

Chapitre 1

Étude Bibliographique

Sommaire

1.1	Introduction	17
1.2	Prolifération microbienne sur matériaux de construction à l'intérieur des bâtiments	18
1.2.1	Généralités sur les micro-organismes	18
1.2.1.1	Classification	18
1.2.1.2	Bacteria - Les Bactéries	19
1.2.1.3	Fungi	21
1.2.1.4	Nutrition et croissance microbienne	22
1.2.1.5	Biofilms	22
1.2.2	Contamination microbienne à l'intérieur des bâtiments	24
1.2.2.1	Pollution de l'air intérieur	24
1.2.2.2	Contamination de surfaces vs. contamination aérienne	25
1.2.3	Méthodes d'investigation des surfaces	26
1.2.3.1	Méthodes de prélèvement	26
1.2.3.2	Méthodes d'analyses	29
1.2.4	Campagnes de prélèvement <i>in situ</i>	36
1.2.5	Protocoles en laboratoire	39
1.2.5.1	Méthodes standardisées	39
1.2.5.2	Sélection des souches	39
1.2.5.3	Technique d'inoculation	41
1.2.5.4	Conditions d'incubation	42
1.2.5.5	Matériaux	44
1.2.6	Bio-réceptivité des matériaux - Facteurs déterminants	44
1.2.6.1	Activité de l'eau - Humidité relative à l'équilibre	44
1.2.6.2	Composition chimique	46
1.2.6.3	pH	46
1.2.6.4	Propriétés de surfaces	47
1.2.7	Conclusion	48
1.3	La photocatalyse comme solution pour la dépollution de l'air et des surfaces	50

1.3.1	Généralités	50
1.3.1.1	Principe	50
1.3.1.2	Description du phénomène	50
1.3.1.3	Facteurs d'influence	52
1.3.1.4	Applications du procédé photocatalytique	57
1.3.2	La photocatalyse appliquée à la désinfection	58
1.3.2.1	Mécanismes et facteurs d'influence	59
1.3.2.2	Facteurs d'influence du processus photocatalytique pour la dé- gradation des micro-organismes	63
1.3.2.3	Mise en oeuvre du photocatalyseur	64
1.3.3	Conclusion	64
1.4	Monoglycérides bio-sourcés	66
1.4.1	Généralités sur les esters de glycérol	66
1.4.2	Activité antimicrobienne des acides gras et de leurs esters	66
1.4.3	Mécanismes d'action	67
1.4.4	Résistance bactérienne	68
1.4.5	Conclusion	68
1.5	Conclusion de l'étude bibliographique	71

1.1 Introduction

La dégradation de la qualité de l'air intérieur est une problématique qui suscite un intérêt majeur dans nos sociétés industrialisées, et ce depuis déjà plusieurs années. La pollution d'origine biologique, provoquée par l'humidité et la présence de micro-organismes dans des environnements confinés, est l'une des principales causes de la dégradation de l'air intérieur. Leur prolifération sur les parois intérieures et le relargage de particules ou molécules toxiques aéroportées peuvent entraîner de sérieux risques pour la santé des usagers.

Ainsi, l'objectif principal de ce travail est de développer des moyens de lutte contre la contamination et la prolifération microbienne sur les matériaux de construction à l'intérieur des bâtiments. Une des solutions pertinentes à envisager réside dans la fonctionnalisation des matériaux de construction.

Dans notre cas, l'idée générale est de développer des dispositifs passifs de type revêtement, ne nécessitant pas d'apport d'énergie spécifique, capables de conférer aux matériaux de construction des propriétés antimicrobiennes.

Différentes technologies sont explorées : (a) la photocatalyse, dont le principe repose sur l'irradiation d'un catalyseur par une source lumineuse, les réactions chimiques engendrées sont de nature oxydoréductrice et permettent la dégradation de la matière organique environnante, et (b) l'utilisation de molécules bio-sourcées aux propriétés hygroscopiques et tensioactives intéressantes, qui en font de bons candidats comme produits antimicrobiens.

Le but de ce chapitre est d'établir les bases des connaissances actuelles, nécessaires à la compréhension, au développement et à l'étude de tels produits.

La première partie présente un état de l'art de la contamination microbienne à l'intérieur des bâtiments. Dans un premier temps, quelques données générales sur les micro-organismes sont présentées, ainsi que le contexte et les enjeux de la contamination de l'air intérieur. Les différentes méthodes de prélèvement microbien sur matériaux et d'analyse des micro-organismes utilisées dans la littérature sont ensuite synthétisées. Dans un deuxième temps, les paramètres d'essais et les normes existantes ayant pour objet l'étude de la prolifération microbienne en conditions de laboratoire sont abordés. Cette partie se termine sur une synthèse des facteurs déterminants de la croissance microbienne sur matériaux de construction.

La deuxième partie de ce chapitre vise à introduire une des technologies considérées : la photocatalyse. Les mécanismes de fonctionnement du processus photocatalytique ainsi que les principaux facteurs influençant l'efficacité des réactions photocatalytiques sont présentés. En cohérence avec l'objet de ce travail, les études mettant en œuvre des particules photocatalytiques d'oxyde de titane sont plus particulièrement détaillées. L'application du processus pour l'inhibition de la prolifération des micro-organismes est également traité, en incluant une description des principaux mécanismes mis en jeu.

La troisième et dernière partie se concentre sur le deuxième type de solution envisagée : l'utilisation de molécules d'ester de glycérol bio-sourcées comme agent de surface. Cette partie regroupe une description générale des monoglycérides et un point bibliographique sur l'activité antimicrobienne des acides gras et de leurs esters et sur leurs mécanismes d'action.

1.2 Prolifération microbienne sur matériaux de construction à l'intérieur des bâtiments

1.2.1 Généralités sur les micro-organismes

1.2.1.1 Classification

Vers la fin des années 70, les recherches de Carl Woese et Georges Fox sur l'ARN ribosomique ont permis de déterminer que tous les organismes vivants pouvaient être classifiés en trois domaines : les *Archaea*, les *Bacteria* et les *Eucarya*, représentés sur la figure 1.1.

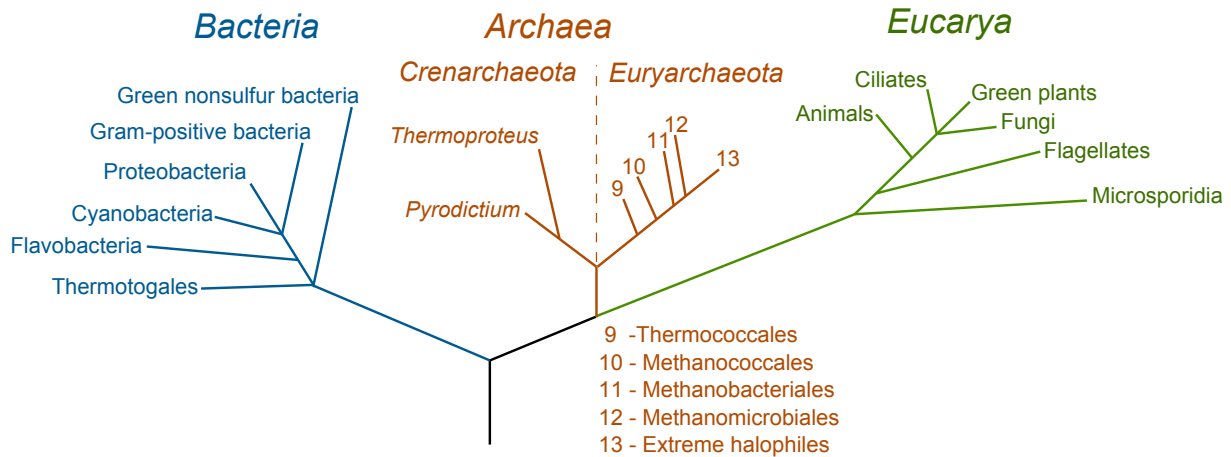


Figure 1.1 – Arbre phylogénétique universel, adapté de Woese *et al.* (1990).

L'utilisation de la taxonomie permet de décrire et classer les organismes vivants afin de les comparer les uns aux autres. Il s'agit de les placer dans des niveaux taxonomiques hiérarchisés. Les organismes de chaque **taxon** partagent des caractères spécifiques et cette hiérarchisation non chevauchante permet d'inclure ces caractères et un nouvel ensemble de caractères plus restrictifs. Il est ainsi possible de nommer différents organismes sans avoir recours à une description précise de l'ensemble de leurs caractères. Le tableau 1.1 présente une partie de la classification hiérarchique des être vivants, rapportée à l'espèce bactérienne *Escherichia coli*.

Rang	Exemple
Domaine (Règne)	<i>Bacteria</i>
Phylum (Division)	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

Tableau 1.1 – Classification taxonomique et exemple de noms. Le domaine et la division sont également visibles sur la figure 1.1 précédente.

1.2.1.2 Bacteria - Les Bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes procaryotes¹, généralement unicellulaires et à paroi rigide, capables de croître et se multiplier par scissiparité aux dépens de substances nutritives. Les bactéries sont abondantes dans le sol, l'eau et l'air. On les retrouve également dans le corps des organismes vivants. L'architecture d'une cellule bactérienne, mise en exergue suite à la découverte et au développement du microscope électronique dans les années 30, est présentée sur la figure 1.3.

Les bactéries se meuvent généralement grâce à des flagelles (1 à 3 selon les espèces) et leurs dimensions varient considérablement selon les espèces. En effet, si la taille moyenne des bactéries est comprise entre 1 μm et 5 μm , les plus petites espèces mesurent 0,1 μm , quand les plus grosses peuvent atteindre 500 μm . Ainsi, les plus petites ont une taille inférieure à celle de gros virus et les plus grandes peuvent atteindre la taille d'une algue.

Par ailleurs, les bactéries peuvent prendre différentes formes caractéristiques, les trois principales étant : les formes sphériques (cocci), les formes cylindriques ou en bâtonnets (bacilles, vibrions) et les formes spiralées (spirilles, grandes bactéries), schématisées sur la figure 1.2. Les bactéries peuvent se regrouper entre elles de différentes façons. On retrouve ainsi des arrangements par paires (diplocoque, diplobacille, etc.), en amas ou "grappe de raisin" (staphylocoque) et en chaîne (streptocoque).

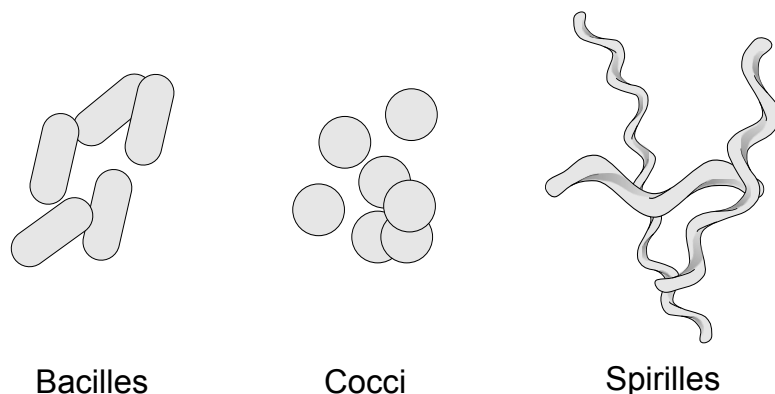


Figure 1.2 – Représentations schématiques des trois formes principales des bactéries.

Les bactéries disposent d'un complexe de membranes, de parois et macromolécules associées qui présentent des fonctions et structures diverses, leur permettant de s'adapter aux conditions plus ou moins hostiles de leur environnement. De part l'infinité des environnements existants sur notre planète, on retrouve en conséquence une infinité de types d'enveloppes bactériennes. Il est important de différencier deux composants de la structure cellulaire : la membrane cytoplasmique, élément commun et nécessaire régissant les processus métaboliques essentiels (respiration, photosynthèse, etc.) et la paroi, située immédiatement à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, plus rigide et ayant un rôle protecteur contre les agressions : agents pathogènes, gradients

1. Les organismes procaryotes sont des êtres vivants caractérisés par l'absence de noyau et d'organites (le plus souvent).

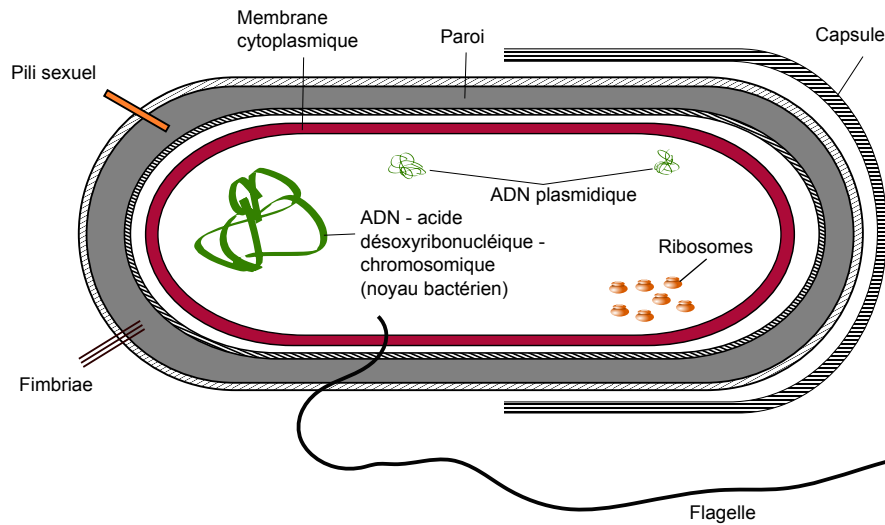


Figure 1.3 – Schéma d'une cellule procaryote, adapté de Leclerc *et al.* (1995)

de concentration de soluté entre l'intérieur de la cellule et son environnement... Sur la base des travaux développés par Christian Gram en 1884, on peut séparer les bactéries en deux groupes distincts, différenciables par la couleur prise par les cellules après réalisation de la coloration de Gram : les bactéries à Gram positif colorées en violet et les bactéries à Gram négatif colorées en rouge ou rose.

La figure 1.4 présente deux schémas correspondant aux deux types d'enveloppes bactériennes. Les parois des bactéries à Gram positif sont simplement formées d'une épaisse couche de peptidoglycane (polymère de dérivés glucidiques et d'acides aminés) de 20 à 80 nm d'épaisseur tandis que les parois des bactéries à Gram négatif sont plus complexes et contiennent une fine couche de peptidoglycane (2 à 7 nm), dans un espace périplasmique variable selon les espèces (pouvant aller jusqu'à 75 nm) et une membrane externe (7 à 8 nm) composée entre autre de nombreux lipopolysaccharides (LPS). En microbiologie, on désigne généralement par le terme d'**enveloppe cellulaire** ou **paroi cellulaire (cell wall)** l'ensemble des structures situées à l'extérieur de la membrane plasmique.

D'autres structures existent, notamment chez les mycobactéries et les mycoplasmes (sans paroi).

La couche de peptidoglycane confère à la cellule sa rigidité, lui permettant de maintenir sa forme et sa pression interne. On considère généralement que cette couche joue un rôle majeur dans la protection des cellules vis-à-vis des agressions extérieures même s'il s'agit d'une couche très poreuse, permettant de laisser passer des particules de 2 nm (Demchick et Koch, 1996). Notons que cette couche de peptidoglycanes constitue près de 90% de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et seulement 10% de la paroi des bactéries à Gram négatif.

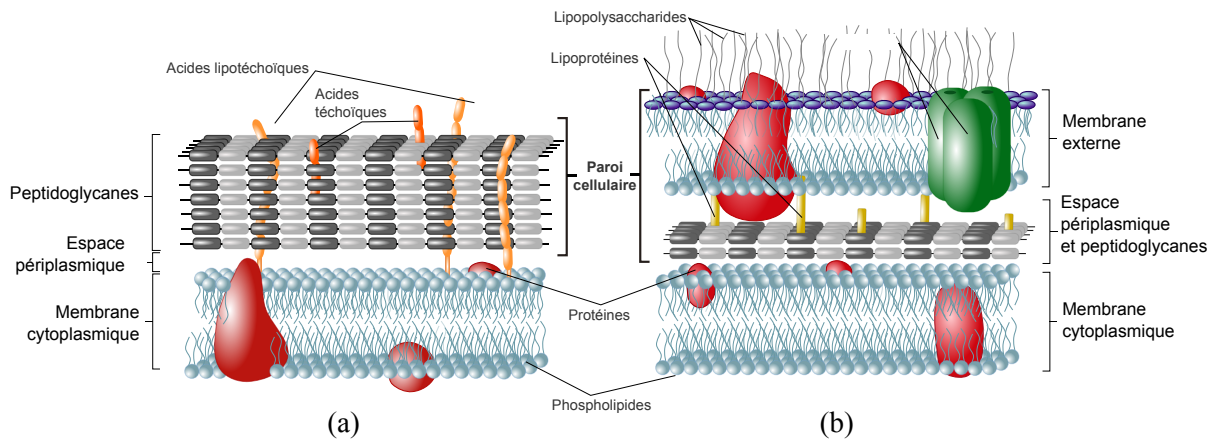


Figure 1.4 – Schéma d'enveloppes bactériennes : (a) Gram +, (b) Gram -, adapté de Prescott *et al.* (2010, chap. 3, p.57)

1.2.1.3 Fungi

Les *Fungi*, également appelé Mycètes, constituent un taxon qui regroupe les organismes appelés plus communément champignons. Il s'agit d'organismes uni- ou pluricellulaires eucaryotes, c'est à dire pourvus de véritables noyaux, dont un exemple est visible sur la figure 1.5. Leur paroi contient de la cellulose et de la chitine et ils sont dépourvus de chlorophylle et de mobilité. La reproduction des champignons peut être sexuée ou asexuée et se fait par la production de spores, qui présentent généralement des caractéristiques de résistance remarquables. Les organismes fongiques sont généralement constitués de cellules végétatives allongées et cloisonnées appelées hyphes. Plusieurs hyphes peuvent s'associer pour former une structure filamenteuse plus épaisse : le mycélium, qui possède un grand pouvoir de pénétration et de dissémination dans le substrat colonisé.

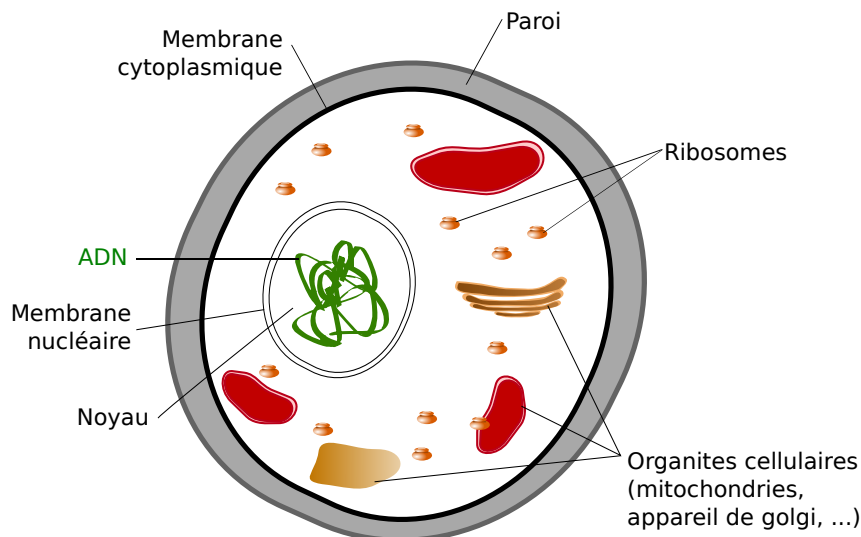


Figure 1.5 – Schéma morphologique d'une cellule eucaryote

1.2.1.4 Nutrition et croissance microbienne

D'un point de vue nutritif, les cellules microbiennes peuvent être classées selon leur besoin en carbone, en énergie et en électrons (Tableau 1.2). De même, une dizaine d'éléments chimiques (C, O, H, N, S, P, Mg, K, Ca, Fe) leur sont nécessaires.

Plusieurs facteurs environnementaux ont une influence sur la croissance des micro-organismes et peuvent l'entraver, l'inhiber ou la favoriser :

- **la température** : elle a une forte influence sur la multiplication microbienne et le métabolisme ; chaque micro-organismes présente une plage de température optimales pour sa viabilité et sa croissance (thermophile, mésophile, ...)
- **le pH** : le développement des moisissures et levures peut se réaliser dans les environnements acides (autour de 3-6) tandis que celui des bactéries est favorisé dans les milieux neutres à légèrement alcalins (autour de 7-7,5). Toutefois, ces gammes de pH sont relativement plus larges selon les organismes (de nombreuses bactéries sont capables de se développer dans des environnement extrêmes, très acides ou très alcalins). On parle d'organismes acidophiles ou basophiles ;
- **l'oxygène moléculaire** : c'est également un facteur prépondérant dans la classification des bactéries et permettant d'appréhender différents groupes : les aérobies stricts qui ont besoin d'oxygène libre pour pouvoir se développer, les anaérobies stricts ne tolérant pas l'oxygène libre, les aéro-anaérobies ou anaérobies facultatives pouvant se multiplier avec ou sans oxygène libre et les micro-aérophiles qui ne peuvent croître qu'en présence d'une faible tension d'oxygène ;
- **l'activité de l'eau**, a_w , indiquant la disponibilité en eau d'un milieu (solide ou liquide) pour des réactions chimiques ou un développement microbien. L'activité de l'eau se définit, à l'équilibre hydrique, comme le rapport entre la pression de vapeur d'eau sur la pression de vapeur saturante à la même température. Pour les matériaux, elle correspond à l'humidité relative à l'équilibre. Les micro-organismes se développent préférentiellement lorsque les valeurs de a_w sont élevées et voisines de 1. Dans les aliments ou les matériaux, la valeur limite de a_w permettant le développement des micro-organismes est généralement estimée autour de 0,60 (Prescott *et al.*, 2010).

1.2.1.5 Biofilms

Depuis les années 40, les chercheurs ont remarqué que les micro-organismes étaient plus souvent retrouvés fixés sur des substrats (organismes sessiles) que flottant librement en milieux aqueux (organismes planctoniques) (Prescott *et al.*, 2010). En effet, sous certaines conditions environnementales, la majorité des communautés microbiennes se développe au sein d'une structure tridimensionnelle complexe dans laquelle les cellules adhérentes sont enveloppées dans une matrice extracellulaire polymérique (*Extracellular Polymeric Substance* - EPS). L'ensemble de cette organisation, généralement appelée biofilm, fournit aux micro-organismes une résistance particulière vis-à-vis des agressions physiques et chimiques telles qu'un traitement désinfectant ou un changement brutal des conditions environnantes (Costerton *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 2010).

Besoins	Types nutritionnels
Source de carbone	
CO ₂	Autotrophes
Composés organiques	Hétérotrophes
Source d'énergie	
Lumineuse	Phototrophes
Chimique	Chimiotrophes
Source d'électrons	
Minéral	Lithotrophes
Organique	Organotrophes
Facteurs de croissance	
Non exigeant	Prototrophes
Exigeant	Auxotrophes

Tableau 1.2 – Tableau synthétique des différents types nutritionnels (Leclerc *et al.*, 1995; Prescott *et al.*, 2010)

Les biofilms sont un moyen de colonisation extrêmement répandu, pouvant se former sur n'importe quelle surface.

Le cycle de formation d'un biofilm est un phénomène relativement complexe, incluant de nombreuses étapes, du pré-conditionnement du substrat par les molécules ambiantes jusqu'au détachement des organismes (Montana State University, 2015; Prescott *et al.*, 2010). On peut cependant le schématiser en 3 étapes principales, représentées sur la figure 1.6 : (i) l'adhésion au support, (ii) la maturation du biofilm, correspondant à la sécrétion de polysaccharides, de protéines, d'ADN et d'autres polymères et à la multiplication cellulaire, et (iii) le détachement cellulaire, permettant la contamination de nouvelles surfaces.



Figure 1.6 – Schéma de formation d'un biofilm (Montana State University, 2015)

1.2.2 Contamination microbienne à l'intérieur des bâtiments

Cette partie concerne la problématique de contamination et de prolifération des micro-organismes dans l'environnement intérieur. Elle cible plus particulièrement les matériaux de construction.

1.2.2.1 Pollution de l'air intérieur

La pollution de l'air intérieur est un problème de santé publique grave et une cause majeure de morbidité² et mortalité dans le monde entier (4,3 millions de morts chaque année). En Europe, le poids total des maladies dues à l'air intérieur est d'environ 2 millions d'EVCI³ par an (EnVIE, 2009). En 2006, l'Organisation Mondiale de la Santé (Bureau régional pour l'Europe) lançait l'élaboration de lignes directrices pour l'amélioration de la qualité de l'air intérieur et présentait les 3 types de pollution intérieure les plus significatives en termes de risques pour la santé publique (WHO, 2006) :

- les polluants biologiques (humidité et moisissures) (WHO, 2009),
- les polluants chimiques (produits sélectionnés) (WHO, 2010),
- les polluants issus de la consommation de combustibles intérieurs (WHO, 2014).

La présence de populations microbiennes dans les environnements intérieurs humides est l'une des principales causes de la dégradation de l'air intérieur et contribue fortement au Syndrome du Bâtiment Malsain (*Sick Building Syndrome* - SBS) ainsi qu'aux maladies liées au bâtiment (*Building Related Illness* - BRI) (Cooley *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997). Ces deux notions sont apparues depuis quelques années déjà dans le domaine de la santé environnementale. Le syndrome du bâtiment malsain regroupe une combinaison de symptômes tels que maux de tête, fatigue chronique, irritation des yeux, difficultés respiratoires, etc. qui affectent les occupants d'un bâtiment et qui sont susceptibles d'être causés par les polluants de l'air intérieur. Ces symptômes ont tendance à disparaître lorsque les personnes touchées quittent le bâtiment. Les maladies liées au bâtiment sont désignées sous le sigle BRI en anglais mais n'ont pas d'équivalent français. Il s'agit d'un terme qui s'applique aux maladies cliniquement diagnostiquées ou aux effets néfastes sur la santé (maladie du légionnaire, réactions allergiques) pour lesquelles un lien de causalité est bien défini entre les polluants de l'air intérieur d'un bâtiment spécifique et les troubles de la santé qui résultent d'une exposition (Seltzer, 1994).

En Europe du nord et en Amérique du nord, on estime entre 20 et 40% la prévalence⁴ de moisissures dans les bâtiments (CSHPF, 2006). Plusieurs centaines d'espèces bactériennes et fongiques ont déjà été identifiées et une trentaine de genres sont retrouvés régulièrement en milieu intérieur (CSHPF, 2006; Gutarowska et Żakowska, 2002; Méheust, 2012; Nolard et Beguin, 2003). On retrouve principalement des champignons tels que *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Alternaria alternata*, *Stachybotrys chartarum* et des bactéries à Gram négatif ainsi que des mycobactéries à l'intérieur

2. Le taux de morbidité correspond au nombre d'individus atteints par une maladie dans une population donnée et pendant une période déterminée.

3. Espérance de Vie Corrigée de l'Incapacité.

4. La prévalence est ici un terme statistique qui exprime le nombre de fois qu'un événement a été observé dans un milieu déterminé, à un moment donné ou pendant une certaine période.

d'habitations et autres bâtiments. Certaines de ces espèces font partie des espèces pathogènes potentiellement dangereuses listées par le Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique de France et l'Association Santé Environnement France (ASEF, Mars 2012; CSHPF, 2006; Reboux *et al.*, 2010). Selon Mendell *et al.* (2011), même si aucune relation causale de l'humidité et des moisissures sur des troubles de la santé des occupants n'a pu être démontrée à ce jour, leur association avec plusieurs problèmes de santé a bien été mise en évidence (Fung et Hughson, 2003; Mendell *et al.*, 2011). Certaines de ces maladies sont par ailleurs déjà répertoriées par l'organisation américaine *Institute of Medicine*.

Les micro-organismes sont capables de produire des contaminants aéroportés tels que des spores, des allergènes, des toxines, entre autres métabolites qui contribuent à la dégradation de la qualité de l'air intérieur et peuvent entraîner de sérieux risques pour la santé des occupants (Andersson *et al.*, 1997; Bellanger *et al.*, 2009; Dillon *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 1994; Santucci *et al.*, 2007; Spengler et Chen, 2000; Torvinen *et al.*, 2006; Tuomi *et al.*, 2000). Une exposition fréquente à ces contaminants, par inhalation ou, dans une moindre mesure par contact ou ingestion, peut conduire à de nombreux troubles de la santé tels que des effets irritatifs et toxiques, des infections superficielles, systémiques, des allergies et d'autres problèmes respiratoires et cutanés (ASEF, Mars 2012; Flannigan *et al.*, 2001; Parat *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1997). L'impact économique et social qui en résulte est considérable (Gutarowska et Piotrowska, 2007; Mudarri et Fisk, 2007; Peat *et al.*, 1998; Peltola *et al.*, 2001). Aux États-Unis par exemple, Mudarri et Fisk (2007) ont estimé que plus de 4,5 millions de cas d'asthme étaient dus à une exposition à l'humidité et aux moisissures, conduisant à un coût annuel d'environ 3,5 milliards de dollars. En Pologne, il s'agit de plus de 8 millions de personnes qui sont exposées à des mycotoxines et des allergènes (Gutarowska, 2001).

Selon Squinazi (2002), la présence de micro-organismes dans l'air intérieur a quatre origines principales :

- l'Homme, par l'émission de gouttelettes salivaires et nasales et de squames cutanées ;
- la dissémination atmosphérique de micro-gouttelettes provenant notamment de réservoirs d'eau contaminés (douches, nébulisateurs, etc.) ;
- les poussières mises en suspension dans l'air, induites par l'activité dans les bâtiments ;
- les surfaces humides, qui deviennent des lieux de prolifération microbienne important, une fois contaminées par l'ouverture des locaux ou par tout contact avec une source porteuse de micro-organismes (humain, animal, vêtements, poussières, etc.).

Les matériaux de construction peuvent aisément devenir des lieux de prolifération microbienne, notamment lorsqu'ils sont soumis à des conditions humides récurrentes ou à des événements mouillants accidentels et contribuer ainsi à la dégradation de la qualité de l'air intérieur.

1.2.2.2 Contamination de surfaces vs. contamination aérienne

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont été consacrées à l'évaluation directe de la pollution de l'air par prélèvements aériens afin d'estimer les risques pour la santé des usagers (Górny, 2004; Gutarowska et Piotrowska, 2007; Pasanen, 2001; Portnoy *et al.*, 2004). Le degré d'exposition à ces contaminants microbiens et les risques associés sont liés à une large

gamme de paramètres, tels que les genres/espèces de micro-organismes (qui déterminent une partie des contaminants), le mode d'exposition (inhalation, contact avec la peau, les yeux, ingestion) et les conditions environnementales (convection, température, etc.), la superficie totale de la croissance microbienne, l'aérosolisation des contaminants, etc. (Doll, 2002). De nombreux auteurs ont suggéré que les prélèvements aériens seuls ne suffisaient pas à décrire la totalité de la flore microbienne présente à l'intérieur des bâtiments, en particulier dans les bâtiments endommagés par l'eau (Andersen *et al.*, 2011; Lappalainen *et al.*, 2001; Raw *et al.*, 1999). Il a notamment été montré que l'identification des micro-organismes issus de prélèvements directs sur matériaux de construction permettait de fournir des informations pertinentes sur les sources potentielles de contaminants microbiens aéroportés (Madsen *et al.*, 2005; Raw *et al.*, 1999). En outre, les espèces produisant des spores mucilagineuses qui restent préférentiellement attachées à des substrats nécessitent l'utilisation de méthodes d'échantillonnage de surface, afin de dresser un inventaire de la biodiversité microbienne le plus complet possible (Raw *et al.*, 1999).

Bien que les communautés microbiennes sur les surfaces ne soient pas directement corrélées aux problèmes de santé des occupants, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France recommande l'échantillonnage direct sur matériaux de construction en plus des prélèvements aériens, afin d'évaluer au mieux la prolifération microbienne à l'intérieur des bâtiments et les risques associés (CSHPPF, 2006).

L'étude des micro-organismes qui prolifèrent à la surface des matériaux de construction est donc indispensable. Cependant, les techniques de prélèvement et d'analyse disponibles sont nombreuses, très diverses, et elles ont un impact les résultats observés. La partie suivante fait le point sur ces méthodes.

1.2.3 Méthodes de caractérisation de la prolifération microbienne sur matériaux de construction

L'objectif de cette partie est de présenter les différentes méthodes d'échantillonnage et d'analyse de la littérature utilisées pour l'évaluation de la prolifération microbienne sur matériaux de construction. De nombreuses techniques sont disponibles mais il n'y a pas vraiment de protocole d'essai spécifique standardisé, ni de recommandation particulière pour les matériaux de construction ce qui explique la grande variété des méthodes employées et potentiellement les écarts parfois observés dans les résultats. Concernant le prélèvement et l'analyse d'échantillons, seules les études concernant les matériaux de construction sont reportées ici. Pour le prélèvement, les méthodes utilisées *in situ* et en conditions expérimentales en laboratoire sont décrites. Certaines études comparatives de l'efficacité des méthodes de prélèvement sont également rapportées.

1.2.3.1 Méthodes de prélèvement

S'il existe de nombreuses méthodes de prélèvement de populations microbiennes sur surface solide, telles que l'écouvillonnage, le prélèvement par adhésif ou par gélose de contact, le processus de collecte *in situ* sur matériaux de construction ne fait pas l'objet de procédure standardisée. En outre, bien que plusieurs de ces méthodes aient été testées afin d'évaluer leur rendement de collecte sur matériaux inertes et non poreux (verre, acier, plastique, etc.), peu

d'études se focalisent sur les matériaux de construction plus poreux et rugueux comme le béton, les enduits, les mortiers, les plaques de plâtre. Au regard de ces problématiques, le groupe de travail "Moisissures dans l'habitat" du Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique de France a établi un consensus sur la méthodologie des prélèvements et préconise l'utilisation, lors d'investigations microbiologiques sur les surfaces de l'environnement intérieur, d'au moins deux des techniques d'échantillonnage suivantes : écouvillon, échantillonnage en vrac, adhésif, impression (gélose contact) (CSHPF, 2006).

La Figure 1.7 montre la fréquence d'utilisation dans la littérature des différentes techniques retrouvées dans des études menées sur matériaux de construction (pour 33 études considérées).

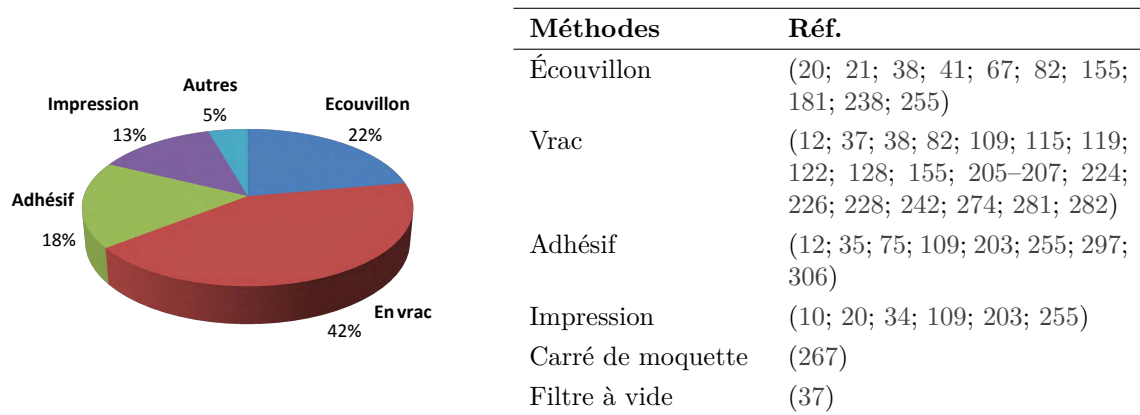


Figure 1.7 – Méthodes d'échantillonnage utilisées dans les études sur matériaux de construction. Pourcentage sur 33 études.

1.2.3.1.1 Écouvillonnage : L'écouvillonnage consiste à frotter une surface contaminée à l'aide d'une tige à "brosse" cylindrique. Il s'agit d'une méthode relativement peu coûteuse et applicable en toutes circonstances. L'écouvillon est généralement choisi lorsque les techniques adhésives ou d'impression (géloses contact) ne peuvent être utilisées du fait d'un accès difficile à la surface (Beguín et Nolard, 1994; Santucci *et al.*, 2007). Cette méthode est adoptée dans différentes études (Bellanger *et al.*, 2009; De Muynck *et al.*, 2010; Ellringer *et al.*, 2000; Lappalainen *et al.*, 2001; Reboux *et al.*, 2009), généralement pour réaliser des prélèvements dans les angles de murs ou sous les seuils de fenêtres. Plusieurs auteurs font état de l'influence de nombreux facteurs sur l'efficacité du prélèvement, tels que la manipulation de l'opérateur (CSHPF, 2006), le type d'écouvillon utilisé (coton, mousse, viscosine, polyester, nylon) et s'il est humidifié ou non (Edmonds *et al.*, 2008; Edmonds, 2009; Méheust, 2012; Rose *et al.*, 2004).

En outre, une étude de Buttner *et al.* (2007) met en avant l'influence majeure du type de matériaux sur l'efficacité du prélèvement. Les auteurs comparent les rendements de collectes par écouvillon et par éponge sur différents matériaux après inoculation artificielle. La quantification des micro-organismes est réalisée par PCR⁵ et le rendement est obtenu en divisant le nombre de cellules bactériennes prélevées sur matériaux par le nombre de cellules préalablement inoculées. Les auteurs expliquent que les efficacités ainsi estimées sont affectées par la technique de prélèvement elle-même et par la surface du matériau support. En effet, les valeurs de rendement les plus élevées sont trouvées sur matériaux lisses, non rugueux et/ou non-poreux : 52 % et

5. Voir partie 1.2.3.2 sur les différentes méthodes d'analyse

47 % pour le verre et 29 % et 11 % pour le bois laminé, en utilisant l'écouvillon et l'éponge respectivement. En comparaison, les rendements trouvés sur béton sont seulement de 0,8 % et 0,7 %.

1.2.3.1.2 Échantillonnage en vrac : L'échantillonnage en vrac est une méthode de prélèvement destructive consistant à gratter, racler ou carotter une petite quantité de matériau, de l'ordre du gramme (0,3 - 5 g), directement à partir de surfaces à analyser. C'est la méthode de prélèvement la plus utilisée pour l'évaluation de la contamination de surface (Figure 1.7). L'isolement des micro-organismes prélevés par échantillonnage en vrac peut être effectué de deux manières : (i) mise en culture directe de l'échantillon prélevé ou (ii) mise en culture d'une suspension obtenue par dilutions successives (Miller, 2001). Dans le deuxième cas, l'échantillon est d'abord plongé dans un liquide physiologique ou rincé à l'aide de solutions de récupération suivant divers protocoles afin d'en extraire les micro-organismes ; des étapes de dilution sont alors possibles avant ensemencement. Si l'isolement n'est pas requis, l'échantillon peut également être analysé par une autre méthode (chimique ou moléculaire) ou directement observé au microscope (Andersson *et al.*, 1997).

1.2.3.1.3 Méthodes adhésives : Ces méthodes reposent sur le principe de l'application d'un adhésif sur la surface à échantillonner, de préférence plane et non humide. Il est alors possible de mettre en culture les micro-organismes adhérents, en appliquant l'adhésif sur un milieu gélosé (Gravesen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1998; Wiktor *et al.*, 2009) ou bien de les observer directement au microscope afin de les identifier ou les dénombrer (Andersson *et al.*, 1997; Boutin-Forzano *et al.*, 2004; Doll, 2002; IEA, 1991; Santucci *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2002).

1.2.3.1.4 Méthode d'impression (gélose contact) : Dans ce cas, un milieu de culture est directement appliqué contre la surface à prélever pendant une période suffisante pour permettre le transfert des micro-organismes. Les plaques d'impression sont ensuite protégées des contaminations aériennes par un couvercle et incubées (Andersen *et al.*, 2011; Beguin et Nolard, 1994; Bouillard *et al.*, 2005; Gravesen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1998; Santucci *et al.*, 2007). Certains travaux ont montré que le pouvoir de transfert varie en fonction de divers paramètres, notamment du temps et de la pression exercée lors du contact (CSHPF, 2006; Santucci *et al.*, 2007). Afin d'éviter ces écueils, les applicateurs retrouvés de nos jours dans le commerce sont généralement standardisés pour un temps et une pression définis.

1.2.3.1.5 Autres méthodes : Dans leurs travaux, Shirakawa *et al.* (2003) utilisent la méthode de prélèvement du carré de moquette, issue des travaux de Mariat et Adan-Campos (1967) dans lesquels il s'agit de frotter un carré de laine stérilisé contre la surface à examiner. Cette technique est généralement utilisée en médecine, pour le prélèvement de *fungi* dans le cas de mycoses. L'ensemencement se fait en appliquant le carré de moquette directement sur un milieu gélosé.

Une autre étude, de Brown *et al.* (2007), évalue l'efficacité d'une méthode de prélèvement par aspiration de spores de *Bacillus atrophaeus*. La surface contaminée est aspirée au moyen d'une

pompe à vide et les spores sont retenues sur un filtre à air HEPA. L'évaluation de l'efficacité est basée sur le quotient du nombre d'UFC⁶ récupérées par cette méthode sur le nombre d'UFC récupérées directement sur un échantillon témoin en acier inoxydable (plongé dans un liquide physiologique). Les résultats obtenus montrent des efficacités entre 19 % et 29 % sur de l'acier inoxydable, des panneaux muraux peints, de la moquette et du béton. Les auteurs précisent que ces différences d'efficacité entre matériaux ne sont pas statistiquement significatives. La méthode n'apparaît pas aussi efficace que l'écouvillonnage sur surface non poreuse, cependant, elle semble permettre une meilleure récupération à partir des surfaces poreuses et permet d'échantillonner de bien plus grandes surfaces. Les auteurs soulignent les limites de détection calculées entre 105 et 160 UFC pour 100 cm² échantillonnés pour ces matériaux.

Certains auteurs insistent sur la nécessité de standardiser les protocoles de prélèvement des micro-organismes sur matériaux de construction (Bellanger *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2007; CSHPF, 2006; Hyvärinen *et al.*, 2002; Santucci *et al.*, 2007). En effet, les résultats obtenus sont dépendants des étapes durant le prélèvement, rendant les résultats des différentes études difficilement comparables et expliquant sans doute la difficulté d'interprétation par rapport aux risques sanitaires.

La littérature ne montre que peu d'études comparatives des différentes méthodes de prélèvement sur matériaux de construction et peu de travaux sur l'influence du type de surface sur l'efficacité du prélèvement. De même, l'influence de l'espèce, du stade d'adhésion et du processus de formation de biofilm des micro-organismes sur le rendement de collecte n'a également été que peu étudié.

1.2.3.2 Méthodes d'analyses

Qu'il s'agisse de quantifier ou d'identifier les espèces présentes sur un échantillon, les différentes méthodes d'analyse microbiologique existantes sont relativement nombreuses et variées. Ainsi, le choix d'une technique préférentiellement à une autre dépend généralement du temps et du coût de réalisation, mais aussi de l'objectif de l'étude. La partie suivante présente une description des principaux types de méthodes d'analyse que l'on retrouve dans la littérature traitant de la prolifération microbienne sur matériaux de construction. Sont considérés : les méthodes par culture, les méthodes par observation, les méthodes chimiques et les méthodes moléculaires.

1.2.3.2.1 Méthodes par culture : La culture de micro-organismes peut être réalisée en amont de toute technique d'analyse permettant l'évaluation quantitative et/ou qualitative de micro-organismes sur des surfaces. La réalisation d'une culture n'est pas obligatoire : elle dépend du choix de l'expérimentateur et de l'objectif de l'étude. Toujours est-il que la nature du milieu a un impact majeur sur la croissance des micro-organismes. Certains milieux, selon leur nature chimique, peuvent être utilisés pour isoler des espèces en favorisant leur développement au détriment d'autres groupes de micro-organismes (on parle alors de milieu sélectif). Samson *et al.* (1994) ont publié des recommandations sur le choix du type de milieu en fonction de l'analyse à réaliser et des micro-organismes à étudier.

6. Unité Formant Colonie

De manière générale, les méthodes par culture sont largement utilisées et recommandées par différentes normes. Du point de vue quantitatif, il est possible d'évaluer, après un temps d'incubation défini, le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) qui se sont développées sur un milieu gélosé. Ce nombre est alors assimilé au nombre de cellules microbiennes initialement présentes sur l'échantillon et peut être rapporté à une masse, un volume ou encore une surface donnée. Bien que les méthodes directes d'identification et de dénombrement après culture soient assez simples à mettre en œuvre, elles sont dans la plupart des cas relativement chronophages.

Depuis quelques années, l'ensemble de la littérature s'accorde à dire que l'utilisation exclusive de méthodes d'analyse basées sur la culture de micro-organismes n'est pas suffisante pour caractériser au mieux la contamination d'un échantillon, car elle se heurte à de nombreux biais. En effet, les méthodes basées sur une culture sont généralement plus sensibles à la qualité du prélèvement effectué que les techniques d'analyse directe (Reboux *et al.*, 2009) ; d'autre part, elles ne rendent compte que d'une fraction des micro-organismes présents dans l'échantillon initial (CSHPF, 2006; Fox et Rosario, 1994; Lawton *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1988; Pasanen *et al.*, 1997; Perfil'ev *et al.*, 1969; Rylander, 1998; Santucci *et al.*, 2007; Saraf *et al.*, 1997; White *et al.*, 1977). Elles ne permettent pas, par exemple, de détecter les microorganismes à croissance très lente ou viables non cultivables (Allion, 2004; Besnard, 2002; Gutarowska et Piotrowska, 2007; Hyvärinen *et al.*, 2002; Santucci *et al.*, 2007) ; elles ne rendent compte que des formes actives, toujours capables de croître sur les milieux disponibles mais pas des formes inactives mais encore viables ou actives mais non cultivables. Par ailleurs, du fait d'une grande variation dans les besoins nutritifs et environnementaux d'une population microbienne à l'autre, la réalisation de plusieurs cultures distinctes s'avère généralement nécessaire pour isoler des micro-organismes (avant identification par exemple) et entraîne donc une charge de travail plus conséquente.

Une campagne de prélèvements de Santucci *et al.* (2007) montre que les profils fongiques retrouvés après une mise en culture à la suite d'un prélèvement par écouvillon ou impression sont différents de ceux retrouvés par observation directe après un prélèvement à l'adhésif. L'identification des genres après une culture permet de retrouver 87 % des profils identifiés par observation directe. En revanche, l'observation directe ne permet de retrouver que 42 % des genres identifiés après une culture.

Sur le plan quantitatif, les écueils des méthodes par culture correspondent généralement à une sous-estimation de la population et surtout des ratios entre espèces. Du point de vue qualitatif, les avantages résident dans les possibilités d'isolement, d'identification des souches par observation visuelle, et surtout de conservation pour une étude secondaire.

1.2.3.2.2 Méthodes d'observation : Les méthodes d'observation, macro ou microscopique, permettent d'estimer quantitativement des populations microbiennes par dénombrement direct (cellules, propagules fongiques⁷, etc.) par coloration plus ou moins spécifique ou par marquage fluorescent suivi d'analyses d'images (Figure 1.8). L'identification fongique est possible jusqu'au niveau du genre ou de l'espèce (cf tableau 1.1, p. 18) par reconnaissance de caractères morphologiques typiques. De manière générale, une telle expertise nécessite du personnel qualifié (CSHPF,

7. Organe de dissémination et de reproduction (hors fruits et individus issus de la reproduction sexuée).

2006; Santucci *et al.*, 2007). Les travaux de Samson *et al.* (2004) et Flannigan *et al.* (2001) sont souvent cités pour les descriptions détaillées d'espèces fongiques, visibles sur la figure 1.9, et leur identification par observation.

Du fait de morphologies assez peu diversifiées, il est très rare de réaliser l'identification de cellules bactériennes par observation. Il est toutefois possible de classer des individus selon la morphologie (Bacilles, cocci, ...) et la coloration de Gram (vu précédemment), mais l'identification au niveau du genre ou d'une espèce n'est généralement réalisée qu'au moyen d'analyses biochimiques (par galeries) ou moléculaires.

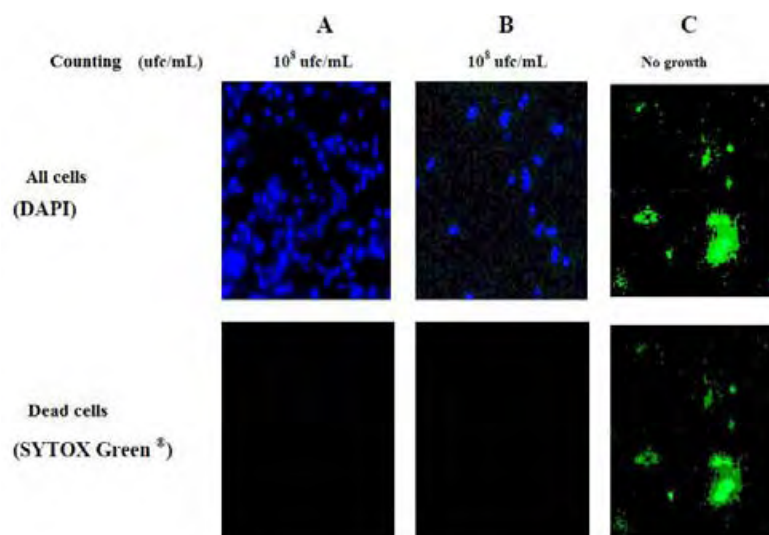


Figure 1.8 – Observation au microscope à épifluorescence (x40) de *Listeria monocytogenes* 10357 (A : cellule en phase stationnaire de croissance; B : Témoin de désinfection; C : Test de désinfection). DAPI : coloration de toutes les cellules, SYTOX : coloration des cellules mortes. (Allion, 2004).

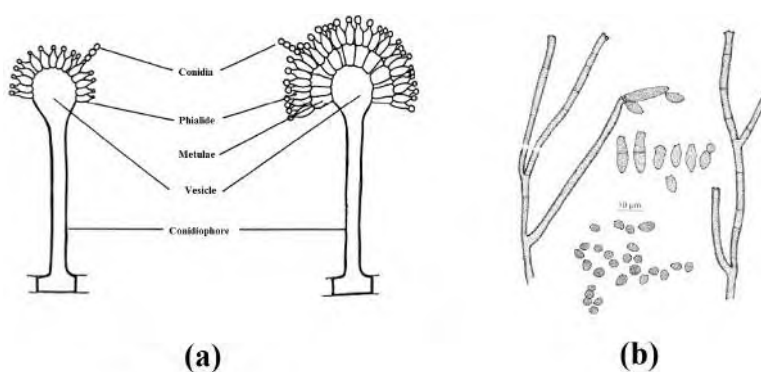


Figure 1.9 – Illustration de la morphologie typique des genres *Aspergillus* (a) et *Cladosporium* (b) (Samson *et al.*, 2004).

Les méthodes d'observation directe basées sur l'utilisation de microscopes et de différents marqueurs peuvent rendre compte de la totalité de la flore adhérente à une surface ou récupérée, qu'il s'agisse de cellules cultivables, non cultivables, viables ou mortes.

La microscopie optique (à fond blanc, noir, à contraste de phase et à fluorescence) par exemple, permet de dénombrer ou de détecter les cellules microbiennes sur un substrat jusqu'à une résolution de 0,2 µm environ (Prescott *et al.*, 2010). On peut en outre y associer l'utilisation

d'hématimètres, tels que la cellule de Malassez et la cellule de Neubauer, souvent utilisés par les microbiologistes. Ces cellules consistent en une lame de verre quadrillée en chambres de numération. Après dépôt d'une suspension et sédimentation des micro-organismes, il s'agit de compter directement le nombre de cellules dans chaque chambre, relativement au volume ou à la surface, afin d'estimer la concentration initiale de la suspension (Murtoniemi *et al.*, 2003; Pasanen *et al.*, 2000; Wiktor *et al.*, 2009).

Ces dernières années, des études en microbiologie se servent de **microscopes à épifluorescence**. Leur principe repose sur l'excitation par ultraviolets d'un composé fluorochrome fixé aux microorganismes. Cette technique quantitative et qualitative présente l'avantage d'être rapide et de donner une bonne estimation de la biomasse adhérente à un substrat (Allion, 2004), de la densité de spores en suspension (Murtoniemi *et al.*, 2003). Elle permet également la différenciation par l'utilisation de marqueurs spécifiques. Son utilisation peut s'avérer avantageuse pour l'analyse de matériaux de construction car elle ne nécessite pas, contrairement au microscope optique, de support d'observation transparent. Dans ses travaux, Allion (2004) a mis au point un protocole rapide permettant d'évaluer *in situ* la viabilité de micro-organismes par marquage direct des cellules adhérentes. Cependant, elle ne permet pas de distinguer les cellules dans des amas trop importants, l'estimation quantitative devient difficile pour les champignons à un stade de développement filamentaire et certains organismes peuvent résister au marquage. Par ailleurs, certains matériaux peuvent être auto-fluorescents et perturber les observations. Les travaux de Méheust (2012) combinent l'épifluorescence et la technologie de **cytométrie en flux**, employée par exemple dans l'estimation de la contamination des eaux, pour quantifier la population fongique d'échantillons de surface prélevés dans un hôpital. Le principe repose sur le défilement à grande vitesse des cellules au travers d'un faisceau laser. L'information est alors obtenue grâce à l'analyse des signaux lumineux ré-émis par les cellules. Cette technique permet également la différenciation viable/non viable par marquage différentiel mais elle n'est pas envisageable pour tout type d'environnement car la poussière contenue dans un échantillon peut venir perturber le signal de détection.

Enfin, les **microscopes électroniques** (à transmission, à balayage, confocal) sont également utilisés dans la littérature. Au même titre que les microscopes à épifluorescence, ils ne nécessitent pas de substrat transparent et sont, de ce fait, souvent utilisés sur les matériaux de construction. Ils permettent par exemple d'observer l'endommagement de matériaux induit par la pénétration d'hyphes fongiques (Gu *et al.*, 1998; Wiktor *et al.*, 2009). Ils rendent également possible l'estimation du nombre de propagules fongiques à partir de bandes adhésives (Andersson *et al.*, 1997) ou encore l'observation directe de la croissance microbienne sur substrat (Pasanen *et al.*, 1992). Adan (1994) par exemple, a réalisé des observations en microscopie électronique à balayage à basse température pour étudier la croissance fongique sur des enduits gypseux. Selon d'autres travaux, la préparation d'échantillons par cryogénisation garantirait une meilleure préservation que par fixation chimique ou autre méthode conventionnelle (Beckett *et al.*, 1984; Beckett et Read, 1986; Samson *et al.*, 1991). La microscopie confocale est un outil plus récent permettant une observation en 3 dimensions. Le marquage des cellules est également possible.

1.2.3.2.3 Méthodes chimiques : Les méthodes chimiques permettent l'analyse de divers paramètres liés aux micro-organismes. Elles sont le plus souvent utilisées afin d'estimer l'activité métabolique et donner ainsi une information sur la toxicité potentielle d'une population microbienne présente sur un substrat. Les méthodes exposées ci-après se réfèrent plutôt à des travaux d'ordre qualitatif ou quantitatif, en termes de contamination et de prolifération microbienne sur matériaux de construction, plutôt qu'en termes d'effet toxique. Généralement, ce type d'analyse repose sur le principe de l'évaluation de composés chimiques issus de cellules microbiennes. Toute la pertinence des méthodes chimiques réside alors dans le choix des éléments à étudier. On distingue généralement deux cas de figures :

Mesure des composants structuraux de cellules microbiennes tels que les composants du mycélium pour les champignons (chitine, ergostérol) (Gutarowska, 2010; Pasanen *et al.*, 1999; Szponar et Larsson, 2000), l'adénosine triphosphosphate (ATP), qui est une molécule productrice d'énergie ou encore les polysaccharides constituant les parois cellulaires (β -D-glucane) (Andersson *et al.*, 1997). La quantité de composants peut être assimilée aux nombres de micro-organismes ou corrélée avec une espèce microbienne. Ces méthodes sont également appropriées lorsque les micro-organismes sont sous forme "inactive" ou non cultivable. Depuis les travaux de Seitz *et al.* (1979), la mesure de l'ergostérol est classiquement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et, comme le montre le Tableau 1.3, pour l'étude de la contamination des matériaux de construction. Selon certains auteurs, elle représenterait une bonne estimation de la biomasse fongique (Pasanen *et al.*, 1999), du nombre de spores (Schnürer, 1993) et du nombre d'UFC (Gutarowska et Żakowska, 2002). Toutefois, bon nombre d'études font remarquer que le taux d'ergostérol mesuré à partir de matériaux dépend de nombreux facteurs, tels que le type de matériau, sa teneur en eau mais aussi l'espèce, l'âge ou encore les conditions de croissance des organismes concernés (Bjurman, 1994; Pasanen *et al.*, 1999; Schnürer, 1993). Selon Nout *et al.* (1987), l'estimation de la biomasse fongique *in situ* ne pourrait pas être réalisée par une quantification comparée de l'ergostérol produit par des champignons en culture, car son taux serait trop dépendant des facteurs d'essais (âge des souches, milieu utilisé, flux d'air).

Mesure des composés directement produits par les micro-organismes tels que le monoxyde d'azote (Murtoniemi *et al.*, 2003) ou les différentes toxines (endotoxines, mycotoxines, etc.) et autres métabolites (Andersen *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 1997; Tuomi *et al.*, 2000). Il s'agit d'une évaluation indirecte de l'activité métabolique ou biologique des organismes, permettant théoriquement d'en déduire la population microbienne. Ce type de méthode est généralement utilisé afin de mesurer la quantité d'éléments potentiellement délétères (métabolites ou composés volatils) et d'estimer le pouvoir pathogène de l'environnement échantillonné et les risques sur la santé qui en résultent.

L'étude de Tuomi *et al.* (2000) précise toutefois que, dans la plupart des cas, la présence de certaines espèces fongiques n'est pas corrélée avec la présence des composés attendus. En outre, différents métabolites peuvent être produits par une même espèce, comme c'est le cas pour *Stachybotrys chartatum* (Andersen *et al.*, 2002). La production peut intervenir à des moments spécifiques de la croissance des organismes : les métabolites secondaires, par exemple, sont généralement produits en fin de phase de croissance. Ainsi, l'étude des composés produits renseigne plutôt sur l'état cellulaire à un instant t que sur le nombre

réel de micro-organismes.

Concernant l'identification, après culture et isolement des micro-organismes, des méthodes biochimiques sont également utilisées. On retrouve notamment les galeries type API, dont le principe s'appuie sur les réactions substrats/micro-organismes (Bouillard *et al.*, 2005; Gutrowska, 2010). Il existe également des protocoles d'identification et de dosage dits "immunologiques" (immuno-chimiques), basés sur l'interaction d'un antigène microbien avec un anticorps spécifique (animal ou humain) préalablement marqué, qui permettent de détecter et de quantifier les complexes antigène-anticorps alors formés. Dans leur étude traitant de la croissance de micro-organismes sur des plaques de plâtre, Murtoniemi *et al.* (2003) utilisent notamment un kit **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), afin d'estimer le taux de cytokine. La méthode **LAL** (Lysat d'Amebocytes de Limule) peut également être utilisée sur matériaux de construction; elle est notamment adoptée par Andersson *et al.* (1997) comme mesure des endotoxines présentes sur des matériaux endommagés par l'humidité. L'utilisation de kits pour ces deux méthodes est intéressante de part la relative facilité de mise en œuvre et le faible coût.

Le Tableau 1.3 présente une synthèse bibliographique des différents composés chimiques et des méthodes de quantification utilisées pour estimer la contamination de surfaces. On notera que les appareils de dosage couramment utilisés dans la littérature comprennent généralement la chromatographie (sur couche mince, en phase liquide à haute performance, en phase gazeuse, ionique) généralement associée à une spectroscopie de masse pour l'identification et/ou la quantification.

1.2.3.2.4 Méthodes moléculaires : Les méthodes d'analyse utilisant la technologie de biologie moléculaire reposent sur le principe de l'isolement de séquences ADN (ARN) précises, de manière à cibler un gène et/ou un phénotype particulier, caractéristique d'une espèce, d'un genre ou d'une famille d'organismes.

Depuis sa découverte dans les années 80 par K. Mullis, la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR en anglais) est devenue un outil quasiment incontournable de la caractérisation des micro-organismes (Prescott *et al.*, 2010).

Les méthodes utilisant le principe de la PCR permettent de détecter, d'identifier et même de quantifier (Rt-PCR, en temps réel) les micro-organismes présents dans un échantillon. Leur principe repose sur l'utilisation d'amorces, qui vont venir délimiter des sections de brins ADN spécifiques à une espèce particulière ou un plus large groupe de micro-organismes.

Ces méthodes peuvent être coûteuses mais présentent l'avantage d'être rapides et considérées très sensibles. Elles permettent également de s'affranchir du biais de la culture, en ciblant aussi bien les espèces cultivables que non-cultivables présentes dans un échantillon mais ne distinguent pas les cellules viables des cellules mortes. Dans une étude sur la contamination fongique dans les habitations ayant subi des dégâts d'humidité, Bellanger *et al.* (2009) détectent l'espèce *Stachybotrys chartarum* sur les surfaces des parois de 21 logements en utilisant la PCR en temps réel, tandis que l'espèce n'est isolée qu'une seule fois avec une méthode par culture. Cette approche nécessite, d'une part, une idée des espèces en présence et d'autre part, une banque de

Composants	Méthodes dosage	Organismes	Références
Endotoxines	LAL ^a	Bactéries	(12)
Mycotoxines	CLHP ^b , CCM ^c , CG ^d , CG-SM ^e , SM-ESI ^f	Fungi	(11; 204; 281; 282)
Monoxyde d'azote (NO)	Griess ^g	Fungi	(197)
Glucanes	LAL, Hydrolyse ^h	Fungi	(12; 118)
Chitine	Hydrolyse, CI ⁱ	Fungi	(118)
Ergostérol	CLHP, CCM, CG, CG-SM	Fungi	(116; 119; 122; 204; 206; 226; 274)
Acide gras 3-Hydroxylés	CG-SM	Bactéries Gram -	(274)
ATP ^j	Bioluminescence	Bactéries	(67)

Tableau 1.3 – Synthèse bibliographique des études utilisant le dosage de composants/composés chimiques pour estimer la contamination microbienne.

- a. Lysat d'Amebocyte de Limule
- b. Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
- c. Chromatographie sur Couche Mince
- d. Chromatographie en phase Gazeuse
- e. CG-Spectroscopie de Masse
- f. Ionisation par Électronébuliseur
- g. Méthode reposant sur l'utilisation du réactif de Griess, permettant de déterminer les micro-organismes qui possèdent une nitrate réductase
- h. Estimation des glucanes (sucres réduits) et de la chitine (différence entre quantité de sucres réduits totale et la quantité de sucre réduits après élimination de la glucosamine, constituant principal de la chitine. Mesures réalisées sur des micro-organismes cultivés après plusieurs jours d'incubation)
- i. Chromatographie Ionique
- j. Adénosine Triphosphate

données génique des micro-organismes afin de choisir les séquences à isoler et, lorsque c'est le cas, les amorces correspondantes. Ainsi, certains auteurs choisissent de balayer une large gamme d'organismes, en ciblant la séquence ADNr 16S (Andersson *et al.*, 1997; Gurtner *et al.*, 2000; Murtoniemi *et al.*, 2003; Rintala *et al.*, 2002) présente chez les procaryotes (18S pour les eucaryotes), tandis que d'autres études ciblent des régions plus spécifiques telle que les régions ITS (Internal Transcribed Spacer) pour certains champignons (Bougoure *et al.*, 2005; Gardes et Bruns, 1993; Midgley *et al.*, 2007; Slippers *et al.*, 2007; Torzilli *et al.*, 2006)). Ces études sur les *fungi* mettent en exergue l'intérêt de coupler la PCR avec des techniques de caractérisation, telles que le Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (ou RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism), qui permettent d'ajouter un degré de spécificité à la recherche. De nouveaux outils permettent, à l'heure actuelle, une analyse globale de l'ADN présent dans un échantillon avec une évaluation à la fois quantitative et qualitative (séquenceur haut débit *MiSeq...*).

Selon différentes études, les analyses moléculaires donneraient une vue de la communauté microbienne plus complète que les méthodes de culture utilisées seules (Buttner *et al.*, 2007; Gurtner *et al.*, 2000).

Les méthodes d'analyse microbiologique sont relativement nombreuses et variées. Par ailleurs, quelle que soit la méthode adoptée, il est essentiel de distinguer deux approches d'analyse : le ciblage d'espèces bien spécifiques ou l'analyse globale de population. Le ciblage est généralement

plus long et nécessite d'avoir une idée des espèces en présence. L'analyse globale est plus rapide, mais elle présente une limite de détection beaucoup plus élevée, qui comporte le risque de ne pas détecter des populations présentes en plus petite quantité. Dans les années 90 par exemple, des études ont montré que l'utilisation de la PCR, couplée à une électrophorèse sur gel en gradient de dénaturation (DGGE) permettait de détecter des populations microbiennes représentant jusqu'à 1 % de la communauté totale (Murray *et al.*, 1996; Muyzer *et al.*, 1993). Dans l'hypothèse où cette communauté totale représente 10^6 cellules microbiennes, cette technique permet donc de détecter des populations de 10^4 cellules, mais toute population constituée par un nombre de cellules inférieur n'est pas détectée. Pour y remédier, il faut avoir recours à l'approche par ciblage d'espèces, ou par séquençage de gènes (méthodes moléculaire) soit par utilisation de plusieurs milieux sélectifs (culture et observations).

Dans l'ensemble, différentes méthodes sont disponibles pour l'échantillonnage et l'analyse des populations microbiennes sur les matériaux de construction. Les résultats d'études sont généralement dépendants des méthodes sélectionnées. Par exemple, un milieu de culture peut promouvoir la croissance d'une espèce au détriment d'une autre et conduire à masquer une partie des micro-organismes lors de la mesure. Concernant les processus d'échantillonnage et d'analyse, une attention particulière doit être portée sur la manipulation des échantillons (contamination). De nombreux auteurs signalent le besoin d'une standardisation des méthodologies d'étude, la comparaison des résultats étant rendue difficile notamment devant le nombre de méthodes disponibles pour l'évaluation quantitative et qualitative de la contamination d'un échantillon. Des critères tels que la surface échantillonnée, le milieu de culture, la méthode de prélèvement, etc. doivent être standardisés pour évaluer la contamination microbienne des matériaux de construction.

1.2.4 État de l'art sur des campagnes de prélèvement *in situ* et synthèse des micro-organismes identifiés

Depuis la fin des années 90, des campagnes d'études *in situ* ont été réalisées dans un objectif d'appréhender au mieux les liens entre micro-organismes de l'environnement intérieur et dangers pour la santé des occupants. Bien que des corrélations directes entre échantillons et maladies des occupants soient très difficiles à établir, des associations moisissures/humidité/problèmes respiratoires sont relevées dans de nombreuses études (Fisk *et al.*, 2007, 2010; Mendell *et al.*, 2011) ainsi que la contribution de certaines espèces aux *Building-Related Illnesses* (BRI) (Pestka *et al.*, 2008).

D'autre part, plusieurs auteurs soulignent que l'estimation du niveau de contamination des matériaux de construction fournirait une bonne image des sources de danger potentiel pour les personnes exposées, que ce soit par l'identification ou par la quantification des espèces, des genres et des contaminants (Andersson *et al.*, 1997; Hyvärinen *et al.*, 2002; Lappalainen *et al.*, 2001). En outre, l'association de certains contaminants microbiens à des matériaux de construction spécifiques donnerait, si elle était établie, des informations hautement utiles en terme de prévention.

La littérature fait ressortir différents facteurs susceptibles d'être impliqués dans la contamination des matériaux de construction tels que l'humidité et la nature des matériaux (plaque

de plâtre, gypse, papier-peint, mortier, peinture, etc.). Il convient de souligner que la plupart des études disponibles dans la littérature se concentrent sur les bâtiments humides et/ou les matériaux ayant subi un dégât des eaux (ou dégât imputable à l'humidité) lors d'investigations sur la présence de micro-organismes. L'ensemble des auteurs s'accorde à dire que l'humidité est un facteur prépondérant de la contamination et du développement microbien sur les surfaces, en favorisant à la fois la concentration et la diversité des micro-organismes sur les matériaux (Andersson *et al.*, 1997; Boutin-Forzano *et al.*, 2004; Santucci *et al.*, 2007).

Divers travaux ont été menés sur les corrélations entre le type de matériau et les micro-organismes identifiés. Les espèces appartenant au genre *Penicillium* sont les micro-organismes les plus souvent rencontrés, tous types de matériaux confondus (Andersen *et al.*, 2011; Andersson *et al.*, 1997; Doll, 2002; Hyvärinen *et al.*, 2002; Rintala *et al.*, 2002; Tuomi *et al.*, 2000). Les espèces du genre *Aspergillus* sont généralement retrouvées sur des matériaux céramiques (béton, mortier), des peintures et colles (Andersen *et al.*, 2011; Doll, 2002; Hyvärinen *et al.*, 2002). On mentionne également la forte occurrence de *Stachybotrys*, en particulier l'espèce *S. chartarum*, dans les matériaux gypseux. Selon Andersson *et al.* (1997), le développement massif et inattendu de *Stachybotrys* dans un environnement si peu pourvu de nutriments serait imputable à une relation synergique avec des fixateurs de diazote, également identifiés en grande quantité dans ces matériaux. Des mycobactéries et des Streptomycètes sont aussi largement retrouvés dans ces matériaux (Andersson *et al.*, 1997; Rintala *et al.*, 2002; Torvinen *et al.*, 2006). Il est important de noter que certains travaux rapportent des associations entre les micro-organismes et le lieu d'échantillonnage plus qu'avec la nature du matériau. Les emplacements d'échantillonnage tels que "murs", "plafonds", "sols" sont indiqués mais aucune information qualitative des surfaces n'est précisée (Bellanger *et al.*, 2009; Reboux *et al.*, 2009; Santucci *et al.*, 2007).

Le Tableau 1.4 présente une synthèse des différents genres identifiés *in situ* (habitation, école ou autres bâtiments) sur divers matériaux à partir de 9 études trouvées dans la littérature. Les méthodes d'identification sont également détaillées. Il ne s'agit pas d'une liste exhaustive, mais bien des micro-organismes qui sont isolés et identifiés le plus fréquemment sur des échantillons de surface de l'intérieur des bâtiments.

Les genres *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Stachybotrys* sont isolés le plus fréquemment, toutes techniques, toutes conditions environnementales et tous types de matériau-support confondus. Cette classification des moisissures les plus souvent identifiées sur surfaces trouve écho dans le rapport de l'*International Energy Agency* (IEA, 1991). Des résultats similaires sont observés sur des échantillons aériens. Les espèces associées sont le plus généralement *C. spheerospermum*, *P. chrysogenum*, *A. niger*, *A. versicolor*, *S. chartarum*. Certaines d'entre elles, de part leur rôle allergisant et toxique reconnu, font notamment partie des espèces potentiellement pathogènes listées par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France et par l'Association Santé Environnement France ASEF (Mars 2012); CSHPF (2006); Reboux *et al.* (2010).

Finalement, selon la méthodologie adoptée, l'étude microbiologique d'échantillons de matériaux de construction provenant de l'environnement intérieur permet de révéler plusieurs informations vis-à-vis des communautés microbiennes présentes. Les observations sur terrain fournissent également des informations sur les potentiels facteurs d'influence de la prolifération microbienne tels que le lieu, l'humidité et le type de matériau. Ces hypothèses peuvent alors être

[illegible]

Tableau 1.4 – Bilan des micro-organismes identifiés le plus fréquemment en environnement intérieur. N.I. = Non identifié, "+" = gène trouvé en quantité supérieure à 10% sur le matériau correspondant.

étudiées, confirmées ou réfutées dans le cadre d'essais en laboratoire. Les conditions expérimentales d'essais en laboratoire permettent d'évaluer l'impact de nombreux paramètres influençant la croissance microbienne (%HR, température, éléments nutritifs, etc.) et requièrent, de ce fait, une attention particulière.

1.2.5 Protocoles en laboratoire : Exposition de matériaux de construction à des micro-organismes

Outre les campagnes de prélèvement *in situ*, des essais de croissance microbienne en laboratoire sont également nécessaires afin d'appréhender les phénomènes régissant le développement des micro-organismes sur les matériaux de construction. Plusieurs types d'essais peuvent être réalisés, selon que l'on souhaite mettre en avant l'effet (antimicrobien) biocide d'un matériau ou simplement observer sa résistance naturelle au développement microbien. Le choix de certains paramètres expérimentaux tels que les souches microbiennes, l'hygrométrie, la technique d'inoculation, etc., dépendent du type d'essai à mener.

1.2.5.1 Méthodes standardisées

La croissance microbienne en général et fongique en particulier peut être extrêmement longue (de plusieurs jours à plusieurs mois), c'est pourquoi les textes recommandent généralement des conditions de croissance optimales, i.e. humidité relative élevée, température autour de 30°C et apport nutritif, afin de limiter le temps de lecture et d'interprétation des résultats. Toutefois, cette démarche se distingue des conditions de croissance naturelle.

Le Tableau 1.5 donne un aperçu de quelques normes existantes sur des essais de croissance microbienne en laboratoire. Le tableau compare les paramètres de chaque norme et type de test (activité antibactérienne, résistance fongique, bio-détérioration, etc.). Les résultats sont généralement obtenus par inspection visuelle des surfaces inoculées ou par mesure de variation de masse des échantillons. Il est intéressant de noter les valeurs relativement élevées de températures et d'humidités recommandées, quelque soit le type de test.

Les normes sur l'activité antibactérienne recommandent généralement de courtes périodes de test (quelques heures) et le contrôle de la surface contaminée est obtenu par étalement de l'inoculum sur une surface bien définie. Pour les surfaces hydrophobes, il est proposé l'utilisation d'un film ou d'une lamelle de verre.

1.2.5.2 Sélection des souches

Des souches microbiennes peuvent être choisies car elles correspondent à un "standard", comme c'est le cas pour la bactérie *E. coli*, à un critère de résistance, lorsque l'on veut tester un matériau antimicrobien par exemple, ou encore à une espèce ou un genre que l'on retrouve fréquemment dans les campagnes de prélèvements *in situ*. Les souches utilisées au cours d'un essai peuvent provenir d'une collection identifiée, telle que l'Institut Pasteur, on parle alors de souches de collection ou de référence, mais elle peuvent également provenir de prélèvements *in situ*, on parle dans ce cas de souches sauvages. Les travaux d'Allion (2004) semblent indiquer que la nature des souches, de collection ou sauvage, pourrait avoir une influence sur la composition

Normes	Type d'essai	Matériaux	Micro-organismes	Inoculation	T°C,%HR	Durée
JIS Z 2801 (136)	Activité antibactérienne	Matériaux antibactérien (plastiques, métaux, céramiques, etc.)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Dépot de goutte	35°C, 90%	24 h
ISO 27447 (135)	Activité antibactérienne	Céramiques : semi-conducteurs photocatalytiques	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	Dépôt de goutte	-	4h-8h
NF EN ISO 846 (202)	Bio-détérioration, effet fongistatique	Plastiques	<i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>P. funiculosus</i> , <i>P. ochroloron</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Glocladium virens</i> , <i>C. globosus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bactérie)	Dépot de goutte ou vaporisation	20-35°C, 95%	≥ 4 semaines
ASTM D 3273 (14)	Effet fongistatique	Revêtements intérieurs	Sol terreux, contaminé avec : <i>A. pullulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp.	Aérienne (chambre environnementale)	32°C, 95%	4 semaines
ASTM D 6329 (15)	Bio-détérioration, effet fongistatique	Matériaux de construction intérieurs	Sol terreux, contaminé avec : <i>Aspergillus</i> spp., <i>Stachybotrys</i> <i>chartarum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp.	Aérienne (chambre environnementale)	32°C, 95%	4 semaines
EUROCAE ED-14E (84)	Bio-détérioration, effet fongistatique	Aéronautique : équipements embarqués	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium funiculosus</i> , <i>Chaetomium globosum</i>	Vaporisation	30°C, 97%	4 semaines
XP ENV 807 (305)	Résistance aux micro-organismes	Produits de préservation de bois (lasures, peintures, etc.)	Sol naturel, terreaux horticole	Enfouissement dans un sol contaminé	27°C, 70%	8-32 semaines
XP ENV 12404 (304)	Effets fongistatique, fongicide	Produits de préservation de mortier (lasures, peintures...)	<i>Serpula lacrymans</i> (ou autre mērule selon région)	Contact direct sur gēlose contaminée	22°C, 70%	12 semaines

Tableau 1.5 – Synthèse de différentes normes d'essais en laboratoire

de la structure pariétale et pourrait *de facto* affecter leur comportement bio-adhésif et vis-à-vis de certains désinfectants.

1.2.5.3 Technique d'inoculation

Les méthodes d'inoculation retrouvées dans la littérature diffèrent selon les auteurs. La figure 1.10 présente les techniques les plus répandues et leur fréquence d'utilisation sur une vingtaine de publications. Le dépôt de goutte (par pipette) et la vaporisation sont généralement les moyens les plus utilisés. La pipette permet de déposer une quantité précise de cellules en suspension sous forme de gouttelette à la surface des matériaux (Chang *et al.*, 1995; De Muynck *et al.*, 2010; Giannantonio *et al.*, 2008; Hoang *et al.*, 2010; Karunasena *et al.*, 2001; Shirakawa *et al.*, 2003), tandis que la vaporisation, en voie sèche ou humide, produit une répartition relativement homogène mais en quantité moins précise, sur une surface plus grande en limitant la phase aqueuse (Brown *et al.*, 2007; Ehrich *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 1998; Gutarowska et Żakowska, 2002; Vacher *et al.*, 2010). Pour palier les défauts d'homogénéité et/ou d'étalement (surfaces hydrophobes) rencontrés avec l'inoculation par dépôt de goutte, certaines normes préconisent l'utilisation d'un film transparent ou d'une lamelle de verre à appliquer directement sur l'inoculum, de manière à standardiser la surface de répartition des cellules (ISO 27447, 2009; JIS Z 2801, 2010).

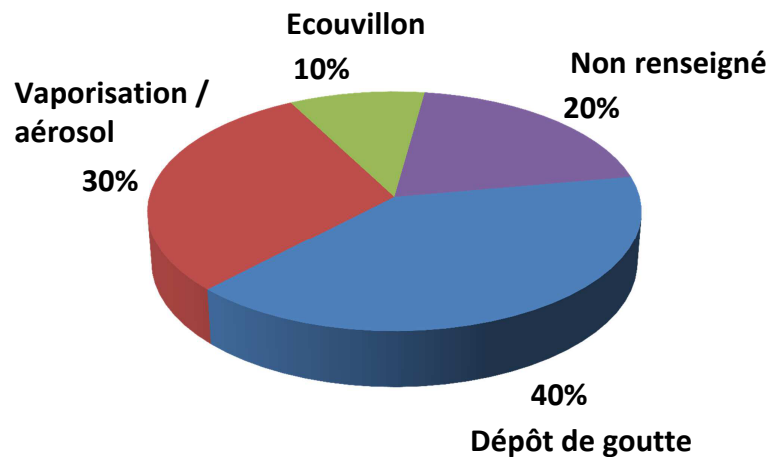


Figure 1.10 – Techniques d'inoculation utilisées en laboratoire, pour des essais sur matériaux de construction. Pourcentage du nombre d'utilisation sur 20 publications.

Dans ses travaux sur la résistance fongique de finitions intérieures, Adan (1994) conteste l'utilisation de suspensions aqueuses pour l'inoculation en expliquant que l'utilisation d'un inoculum liquide peut créer un déséquilibre hydrique initial entre le substrat poreux et l'air adjacent et ainsi fournir des conditions d'humidité favorable à la croissance fongique mais non représentative de la réalité. Il inocule donc en transférant des conidies sèches par brossage de la surface des échantillons à l'aide d'un écouvillon sec stérile.

Hoang *et al.* (2010) ont développé une technique d'inoculation "naturelle" au cours de laquelle des matériaux humidifiés sont exposés à l'air ambiant d'un logement résidentiel pendant 10

jours. Cette méthode est semblable à l'utilisation d'une chambre environnementale, au sein de laquelle les échantillons ne sont pas directement inoculés par l'expérimentateur, mais par la production de spores des micro-organismes présents dans le sol terreux de la chambre. Dans ce type de contamination, les protocoles recommandent la réalisation d'un test de "virulence" de la chambre, qui consiste généralement à placer une boîte de Petri gélosée et mesurer le temps qu'il faut pour observer le recouvrement total du milieu de culture par les micro-organismes (ASTM D 3273, 2012; XP ENV 807, 2001). Ces tests de virulence garantissent le niveau de contamination des échantillons par voie aérienne.

1.2.5.4 Conditions d'incubation

L'incubation correspond à la période de l'essai pendant laquelle les micro-organismes sont en contact avec le matériau. Parallèlement à la nature même du matériau, les conditions d'incubation telles que l'hygrométrie, la température, etc. ont un impact direct sur leur croissance. Le tableau 1.6 synthétise les différents paramètres de conditions d'incubation retrouvés dans la littérature pour des essais de prolifération microbienne sur matériaux de construction.

Une humidité relative de l'air élevée favorise la croissance fongique et bactérienne pendant les essais. L'ensemble des normes d'essais de croissance microbienne recommande une humidité relative des chambres environnementales (ou des étuves de test) entre 70% et 97%, selon les essais (CF Tableau 1.5). Au cours d'essais de courtes durées (quelques heures), l'inoculation est généralement réalisée avec un milieu aqueux, par pipettage ou vaporisation. Dans ce cas, le maintien d'une humidité relative élevée permet d'éviter le dessèchement de l'inoculum. Dans les autres cas, une humidité relative élevée contribue à maintenir des conditions de croissance optimales pour les micro-organismes afin de réduire au minimum la durée de l'essai. Les différents dispositifs de régulation de l'humidité relative de l'air utilisés sont de nature variable : solution salines (Chang *et al.*, 1995), vermiculite (Wiktor *et al.*, 2009), récipient rempli d'eau (De Muynck *et al.*, 2010), système spécifique avec contrôle du flux d'air (Nielsen *et al.*, 2004), etc. Toujours dans un objectif de croissance optimale pour réduire la durée des tests, il est parfois nécessaire de préparer les matériaux en amont. Les normes sur la prolifération fongique recommandent notamment de placer les échantillons en atmosphère contrôlée avec une humidité relative supérieure à 50% pendant plusieurs jours avant test. Plusieurs études mettent en place de tels conditionnements (Chang *et al.*, 1995; Gutarowska et Żakowska, 2002; Hoang *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2004; Shirakawa *et al.*, 2003). Ce processus de préparation est une étape clef dans les études de contamination microbienne des matériaux de construction.

La croissance microbienne dépend aussi fortement des températures cardinales (Prescott *et al.*, 2010), qui correspondent aux températures minimale, maximale et optimale de croissance et sont spécifiques à un genre ou une espèce. Les normes recommandent majoritairement des températures selon les espèces choisies (Tableau 1.5). L'essai est alors mené dans un incubateur à une température le plus souvent supérieure à 25°C, mais il peut également être mis en œuvre à température ambiante pour satisfaire aux conditions de terrain. La variable est alors la durée de l'essai.

L'apport d'une source nutritive (gélose, bouillon, etc.) sur un substrat permet un développe-

Réf.	Matériaux	T°C	%HR	Contrôle %HR	Apport nutritif	Durée
(221)	Bois, plaques de gypse, papier-peint	20-23	75, 80, 95	Chambre étanche + solutions salines sursaturées	Non	31 et 55 jours
(111)	Bétons	30	"élevée"	Flux d'air continu	Oui (vaporisation)	174 jours
(48)	Plaques faux-plafond	21 ± 3	N.R.	Solutions salines	Non	28 jours
(268)	Gypse naturel, phosphogypse	32 25	95-100 100	N.R.	Non	4 semaines
(143)	Plaques faux plafond, avec/sans cellulose	25	80	Flux d'air filtré, coupelle d'eau	Oui/Non Oui/Non	14 jours 10 jours
(116)	Béton cellulaire, plâtre, gypse, carton peint	22-25	70-80	N.R.	(TSB) Oui	2 ans
(267)	Enduits de mortier	25	75, 85, 100	Solutions salines	(vaporisation) Oui (trempage)	30 jours
(75)	Bois, plaques de gypse, plaques faux plafond	-	75, 85, 95	Chambre climatique + solutions salines sursaturées	Non	5 semaines
(197)	Plaques de plâtre	20-23	N.R.	Coupelle d'eau + aération filtrée (1fois/jours, 10min, 400ml/min)	Non	Jusqu'à stabilisation de la croissance
(204)	Plaques de plâtre et gypse, bétons, mortiers, papier-peint, etc.	25 20 10 5	69, 78, 86 76, 86, 90 80, 90, 95 79, 87, 91	Système avec bassin bouillonnant, flux d'air humide/sec contrôlé	Non	7 mois 4 mois 4 mois 4 mois
(31)	Murs à ossature bois	20 - 35	70 - 95	Chambre climatique	Non	16-19 semaines
(100)	Bétons, mortiers	25	95-100	N.R.	Oui (vaporisation)	7 jours
(297)	Pâtes de ciment	26	N.R.	Vermiculite humidifiée	Non	4 semaines
(123)	Matériaux verts (plaques de tournesols, plancher de bambou), etc.	30	90-95	Solutions salines (K ₂ SO ₄)	Oui (plusieurs)	3 à 8 semaines
(284)	Plaques de plâtre et d'aluminium	28	95	Enceinte climatique	Non	45 jours
(138)	Bois, gypse, plaques de ciment, etc.	10, 22	75 - 95	Chambre climatique + flux d'air contrôlé	Non	12 semaines

Tableau 1.6 – Synthèse bibliographique des conditions d'essais de prolifération microbienne sur matériaux de construction. N.R. = Non Renseigné

ment microbien pérenne et un processus de croissance accéléré mais s'éloigne des conditions de croissance naturelle. En revanche, l'absence de source nutritive ajoutée permet de se rapprocher des conditions de terrain mais le développement microbien est incertain et beaucoup plus long. En outre, les résultats qui peuvent être observés à la suite d'un essai avec ou sans apport nutritif n'apportent pas la même information.

La norme NF EN ISO 846 (1997) décrit notamment deux essais différents. Dans un cas, les éprouvettes sont au contact des micro-organismes en présence d'un milieu nutritif incomplet (sans source de carbone), afin d'observer la résistance intrinsèque du substrat au développement microbien : les micro-organismes ne peuvent croître qu'au détriment du matériau. Dans l'autre cas, leur développement est favorisé par l'apport d'un milieu nutritif complet : toute inhibition traduit alors un effet à minima fongistatique⁸ du matériau.

1.2.5.5 Matériaux

Le Tableau 1.6 présente différents types de matériaux utilisés dans les travaux de contamination artificielle. On retrouve quelques études réalisées sur béton et mortier, papier-peint, dalles de faux plafond, mais ce sont les matériaux à base de gypse qui sont les plus fréquemment utilisés. Il est important de noter que très peu d'études se basent sur la caractérisation physicochimique et la caractérisation de surface des matériaux pour justifier leur choix ou tenter d'expliquer les mécanismes d'adhésion et de prolifération à leur surface. Généralement, les matériaux choisis sont ceux retrouvés en environnement intérieur, selon la région géographique de l'étude. Ces matériaux sont soit prélevés sur site, soit achetés neufs chez un fournisseur. En outre, la plupart des essais sont essentiellement centrés sur la prolifération microbienne en terme de toxicité, de résistance des matériaux ou d'effet antimicrobien ; ils sont rarement menés pour décrire et expliquer les interactions substrats/organismes qui entrent en jeu lors du processus de croissance microbienne.

1.2.6 Bio-réceptivité des matériaux - Facteurs déterminants

Cette partie décrit les différents facteurs de croissance microbienne mis en exergue dans des travaux en laboratoire. Les résultats pointent en particulier le rôle prépondérant de l'eau et de la composition chimique et du pH des matériaux.

1.2.6.1 Activité de l'eau - Humidité relative à l'équilibre

Le rôle déterminant de l'eau sur la croissance microbienne fait l'unanimité dans la littérature. Selon l'IEA (1991), la sensibilité d'un substrat à la contamination microbienne dépend dans une large mesure de l'activité de l'eau. L'activité de l'eau, a_w , d'un solide (ou d'un liquide) est directement liée au potentiel aqueux, qui affecte la pression exercée sur la cellule d'un micro-organisme (Brown, 1976; Scott, 1957). Lorsque l'équilibre hydrique est atteint dans un système, l'activité de l'eau est définie comme le ratio de la pression partielle de vapeur sur la pression de l'eau pure (pression de vapeur saturante), i.e. 1/100 de l'humidité relative à l'équilibre (HRE) à une température donnée.

8. Qui inhibe le développement fongique

Le terme "activité de l'eau" est largement répandu, en particulier dans le domaine de la sécurité alimentaire. Elle est relativement facile à mesurer et son impact significatif sur la croissance microbienne est étudié depuis de nombreuses années (Ayerst, 1969; Corry, 1987; Gibson *et al.*, 1994; IEA, 1991; Leong *et al.*, 2006; Mugnier et Jung, 1985; Parra et Magan, 2004; Sautour *et al.*, 2001). On estime que la croissance microbienne n'est plus limitée par l'activité de l'eau pour des valeurs de a_w supérieures à 0,7 (jusqu'à 1, qui est sa valeur maximale) pour la plupart des micro-organismes (Brown, 1976; IEA, 1991; Pitt et Christian, 1968). Le développement de la contamination commencerait autour de 0,8 pour des moisissures fréquemment rencontrées sur matériaux de construction, comme le montre le tableau 1.7. Il est essentiel de retenir que l'activité de l'eau et la température sont inter-dépendants. Il a notamment été montré qu'une augmentation de la température conduit à une réduction du niveau de a_w requis par certains micro-organismes pour croître (Ayerst, 1969; Grant *et al.*, 1989). La disponibilité en eau a également une influence majeure sur la production de spores et mycotoxines (Li et Yang, 2004).

Colonizer group	a_w range	Classification	Fungal example
Colonisateurs primaires (<i>fungi</i> ambiants)	>0.8	Xerophilic/ Xerotolerant	<i>Penicillium chrysogenum</i> , and <i>Aspergillus versicolor</i> : les plus communs ; <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. ustus</i> , <i>Eurotium</i> spp., <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. palitans</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , and <i>Wallemia sebi</i>
Colonisateurs secondaires	0.80-0.9	Mesophilic	<i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Phoma</i> spp., and <i>Ulocladium</i> spp.
Colonisateurs tertiaires (<i>fungi</i> dégâts dus à l'eau)	>0.9	Hydrophilic	<i>Chaetomium globosum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Memnoniella echinata</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Trichoderma</i> spp. (<i>T. atroviride</i> , <i>T. citrinoviride</i> , <i>T. harzianum</i> , and <i>T. longibrachiatum</i>)

Tableau 1.7 – *Fungi* se développant sur matériaux de construction et valeurs d'activité de l'eau a_w requise pour leur croissance (Li et Yang, 2004)

Dans les travaux qui traitent de la contamination microbienne de matériaux de construction, les auteurs raisonnent plutôt en terme d'HRE (Boutin-Forzano *et al.*, 2004; Johansson *et al.*, 2012, 2013; Nielsen *et al.*, 2004; Pasanen *et al.*, 2000). Les matériaux de construction deviennent vraisemblablement la cible de prolifération microbienne lorsque les valeurs d'HRE sont supérieures à 70% pour les matériaux à base de bois, 85% pour les matériaux gypse et autour de 90-95% pour les matériaux cimentaires (Johansson *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2004).

Les travaux de Johansson *et al.* (2012) fournissent différentes gammes de %HR critiques (valeurs permettant la croissance microbienne après 12 semaines d'incubation) selon la nature des matériaux. Ils soulignent également l'influence de la température, du temps d'incubation et des critères d'évaluation de la croissance fongique sur les résultats de tels essais.

Adan (1994) rapporte quant à lui une augmentation significative du taux de développement de *P. chrysogenum* au cours d'essais sur des matériaux gypseux lors du passage de 86%HR à 97%.

De nombreux auteurs suggèrent que la croissance fongique reste minimale sous des conditions non mouillantes autour de 85-95%HR et montrent que les évènements mouillants (inondation, fuite d'eau, condensation, etc.) favorisent à la fois la germination, la prolifération et la diversité des moisissures sur les matériaux de construction (Black et Straube, 2007; Doll, 2002; Pasanen *et al.*, 1992,, 1991).

D'autres études soulignent également que la mesure d'HRE peut être utilisée comme indicateur du risque de contamination microbienne sur matériaux de construction dans les bâtiments ayant subi des dégâts des eaux (Boutin-Forzano *et al.*, 2004; Pasanen *et al.*, 2000). Pasanen *et al.* (2000) rapportent notamment que l'HRE des matériaux renseigne plus sur la disponibilité en eau pour les micro-organismes que ne le fait la teneur en eau des matériaux. D'autres auteurs ont aussi développé des modèles mathématiques utilisant l'humidité relative comme paramètre principal pour la prédiction de prolifération des moisissures (Adan, 1994; Isaksson *et al.*, 2010; Sedlbauer, 2001, 2002; Thelandersson et Isaksson, 2013; Viitanen *et al.*, 2010).

1.2.6.2 Composition chimique

Les éléments ou composés chimiques entrant dans la composition des matériaux colonisés constituent une source nutritive potentielle à même de favoriser le développement des micro-organismes (Adan, 1994; Lugauskas *et al.*, 2003; Santucci *et al.*, 2007; Vacher *et al.*, 2010).

D'autres études, de Hoang *et al.* (2010) et Gutarowska (2010), indiquent que les matériaux à base de cellulose, qui peut être métabolisée par certains micro-organismes, sont plus sensibles à la colonisation que les matériaux inorganiques (gypse, mortier, béton, etc.). Outre la composition chimique, Hoang *et al.* (2010) précisent que l'apport externe de poussières, de composés organiques, etc. sur une paroi peut également constituer une source nutritive et qu'il s'agit d'un facteur augmentant le risque de colonisation, même sur des matériaux qui n'y sont pas ou peu sensibles naturellement, tel que le placoplâtre. De la même manière, l'ajout d'une source de carbone (carboxyméthylcellulose) ou de certaines peintures émulsions par exemple, peut fournir des nutriments induisant aussi une réduction du niveau de a_w nécessaire à la croissance de moisissure (Ayerst, 1969; Grant *et al.*, 1989).

A contrario, la composition chimique de certains matériaux et leurs propriétés physiques peuvent constituer un facteur perturbant le développement microbien. Les récents travaux de Dalod (2015) ont notamment mis en évidence l'impact de la composition chimique sur la colonisation de ciments par les micro-algues *Klebsormidium flaccidum*. Dalod observe que les ciments alumineux ont tendance à mieux résister à la colonisation que les ciments Portland ordinaires, à la fois en conditions accélérées de prolifération en laboratoire (essai de ruissellement et en conditions réelles). Notons que dans le cas des ciments alumineux, le mécanisme à l'origine de la résistance à la prolifération des micro-organismes à leur surface n'est pas encore bien appréhendé (Hérisson *et al.*, 2014; Lavigne *et al.*, 2015).

1.2.6.3 pH

La plupart des bactéries préfèrent les pH neutres. Ainsi, à court terme, les matériaux cimentaires, avec des pH plutôt alcalins (autour de 12-13) sont relativement peu sensibles à la colonisation. Néanmoins, avec le temps, la carbonatation réduit le pH de ces matériaux vers des

valeurs plus faibles, autour de 9, et permet ainsi un développement microbien à leur surface.

Quelques études traitent de la contamination de mortiers ayant subi une exposition à des conditions de carbonatation accélérée et montrent que leur bio-réceptivité s'en trouve considérablement augmentée (Dalod, 2015; Shirakawa *et al.*, 2003; Wiktor *et al.*, 2009; Wilimzig et Bock, 1994). Ces matériaux, normalement peu enclins au développement microbien, deviennent alors, dans des conditions environnementales favorables (généralement une forte humidité) la cible d'une forte contamination.

L'étude de Tran *et al.* (2012) confirme également le rôle prépondérant du pH vis-à-vis de la colonisation de mortiers par des algues phototrophes. Dans ces travaux, la colonisation des mortiers carbonatés survient plus tôt (15 à 20 jours) et se propage plus rapidement : la contamination totale de la surface des mortiers (100%) est atteinte après 90 jours environ sur mortier sain et après seulement 30 jours sur mortier carbonaté, soit une propagation 3 fois plus rapide.

1.2.6.4 Propriétés de surfaces

Il est largement répandu que la contamination et la croissance microbienne sur les matériaux de construction sont conditionnées par la présence en quantité suffisante de nutriments et d'eau disponible. Il convient également de souligner que la plupart des matériaux de construction sont caractérisés par une porosité et une rugosité en surface élevées, leur conférant des propriétés particulières vis-à-vis des phases d'adsorption. Lorsque l'humidité relative de l'environnement est élevée ou lorsque survient un évènement mouillant, les matériaux poreux et/ou rugueux peuvent devenir de véritables réserves d'eau pour les micro-organismes et leurs micro-cavités peuvent offrir de vastes surfaces où croître (Hoang *et al.*, 2010). La rugosité de surface et la porosité peuvent en outre favoriser l'attachement et la rétention de nutriments apportés par l'activité dans les bâtiments (poussières, vent, frottement, etc.).

L'étude de Tran *et al.* (2012) démontre également l'influence de la rugosité sur la colonisation de mortier par les algues. Les auteurs observent que les échantillons rugueux sont colonisés bien plus rapidement que les échantillons lisses. Les aspérités favorisent l'attachement et la croissance des algues (Deruelle, 1991; D'Orazio *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2012). Ces résultats ont également été observés sur certains types de ciment dans les récents travaux de thèse de Dalod (2015). L'auteur précise toutefois que la rugosité de surface n'a qu'une faible influence devant la porosité totale et la composition chimique des ciments. D'un autre côté, Adan (1994) observe que la diminution de la rugosité de finition au gypse accélère la croissance fongique, avec un effet plus marqué pour les valeurs faibles de rugosité. Il suggère que les zones d'interfaces fongiques sont alors agrandies, ce qui promeut les processus interactifs. Néanmoins, il note un léger retard dans la croissance fongique pour les échantillons gypseux avec de faibles porosités ($E/C < 0,6$), traduisant une diminution probable de la disponibilité des nutriments. Notons que la notion de rugosité, dans l'étude de Adan (1994), est à considérer à l'échelle cellulaire.

Tous ces travaux semblent supporter l'hypothèse de Coppock et Cookson (1951) sur l'existence d'une relation entre la croissance microbienne et la porosité et éventuellement la distribution de la taille des pores des substrats, même si aucune corrélation claire n'a encore été établie aujourd'hui.

Plusieurs études se sont déjà concentrées sur les phénomènes mis en jeu lors de l'adhésion de

micro-organismes à des matériaux non poreux, tels que des métaux, des verres, des plastiques, etc (Allion, 2004; Busscher *et al.*, 1984; Chavant *et al.*, 2002; Fletcher et Loeb, 1979) et sur les mécanismes de l'adhésion bactérienne aux biomatériaux et les interactions matériaux-bactéries (Katsikogianni et Missirlis, 2004). De manière générale, les phases mises en jeu lors de l'étape d'adhésion (première étape du biofilm) sont largement décrites dans la littérature. Ces travaux mettent en évidence le rôle prépondérant des réactions physicochimiques et électrochimiques qui peuvent avoir lieu entre le substrat et les organismes. L'état de l'art de Katsikogianni et Missirlis (2004) souligne les facteurs déterminants de l'adhésion microbienne, notamment les caractéristiques surfaciques du matériau support :

- la composition chimique,
- la charge surfacique,
- l'hydrophobicité
- la configuration physique de surface (porosité et rugosité)

Cependant, ce genre d'étude n'a été que très peu ou pas menée sur les matériaux de construction, leur nature poreuse et leur comportement vis-à-vis de l'eau rendant leur analyse plus complexe. On retrouve toutefois certains logiciels commerciaux qui fournissent des courbes de croissance en fonction de l'hygrométrie et du type de matériaux. Cependant, ces modèles ne tiennent pas nécessairement compte des espèces impliquées et des paramètres déterminant liés aux matériaux (pH, propriété de surfaces, ...). Aussi, le manque d'information sur les interactions organismes-matériaux de construction ne permet pas d'appréhender correctement les mécanismes du développement microbien sur ces matériaux, et rend les interprétations et les prédictions de prolifération relativement difficiles.

1.2.7 Conclusion

L'étude de la prolifération microbienne sur matériaux de construction est souvent proposée comme une étape nécessaire dans le contexte de la dégradation de la qualité de l'air intérieur par les micro-organismes. Des investigations *in-situ* sont menées pour dresser une image de la flore microbienne qui s'y développe et identifier les potentiels contaminants pouvant affecter la santé des usagers.

De nombreuses méthodes d'échantillonnage et d'analyse sont utilisées dans les études sur la contamination de matériaux de construction. L'écouvillonnage, les méthodes par adhésif et les méthodes par gélose contact sont des méthodes initialement développées en microbiologie pour des surfaces lisses et ne sont pas nécessairement adaptées à ce genre de matériau rugueux et poreux. Les quelques études traitant de leur rendement sur le béton ont montré des rendements de récupération très faibles comparativement à l'acier ou au verre. Il est important de souligner le réel besoin d'adapter et de standardiser les méthodologies d'évaluation, en diversifiant les techniques par exemple, afin de rendre compte des populations microbiennes qui colonisent les matériaux de construction avec le plus de précision possible. En outre, l'ensemble des méthodes d'analyse disponibles (basées sur la culture et/ou l'observation, chimiques, moléculaires) offre un large panel de systèmes d'évaluation selon la stratégie de l'étude. Une standardisation serait utile dans le choix de la méthodologie à adopter en fonction de divers paramètres tels que l'objectif de l'étude, le type de matériau, le lieu et la surface de prélèvement, etc. À notre connaissance, il

n'y a pas, à ce jour, de consensus sur une stratégie d'évaluation de la contamination microbienne sur matériaux de construction.

La littérature présente d'ores-et-déjà une liste de micro-organismes, dont certains sont potentiellement toxiques (allergènes), qui colonisent les surfaces en fonction de plusieurs facteurs comme le type de matériau et l'humidité. Les micro-organismes les plus souvent identifiés sur matériaux de construction dans l'environnement intérieur, toutes techniques confondues, sont les champignons *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Stachybotrys* et des bactéries à Gram négatif, des bacilles à Gram positif et des mycobactéries. Les essais en laboratoire permettent d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes qui gouvernent le développement microbien sur matériaux de construction.

Des normes ont déjà été développées pour évaluer la résistance à la prolifération et l'activité antimicrobienne de certains matériaux mais peu sont adaptées aux matériaux de construction comme les plaques de plâtre ou les matériaux cimentaires, généralement caractérisés par une grande porosité, une rugosité de surface, et des compositions chimiques bien spécifiques. Ces normes recommandent habituellement des conditions qui favorisent la croissance microbienne pour réduire les temps d'essais, i.e. une hygrométrie élevée (température et humidité) et un apport nutritif, mais qui peuvent s'éloigner des conditions réelles de l'environnement intérieur. Les méthodes d'évaluation proposées sont généralement basées sur l'observation visuelle et le comptage des UFC.

Dans l'ensemble, la littérature s'accorde sur le rôle prépondérant de l'eau sur la croissance microbienne : la croissance sur matériaux de construction est favorisée pour des valeurs d'activité au dessus de 0,75. La composition chimique et le pH des matériaux influencent également la croissance microbienne. Il est important de noter que très peu d'informations sont disponibles sur une corrélation entre la nature, l'intensité de la prolifération microbienne et la nature minéralogique et chimique des matériaux dans le contexte de la prolifération sur les matériaux à l'intérieur des bâtiments. En outre, la caractérisation des interactions physico-chimiques substrat/micro-organismes ainsi que des phénomènes propres à leur adhésion sur ces matériaux n'est pas encore étudiée. Ce manque d'information est une grande lacune vis-à-vis de la compréhension et de la prédiction du développement microbien sur ce type de matériau particulier.

1.3 La photocatalyse comme solution pour la dépollution de l'air et des surfaces

Dans le contexte de la dégradation de l'air intérieur et de la prolifération de micro-organismes sur les matériaux de construction, l'utilisation de la photocatalyse est envisagée comme une solution simple, efficace et peu coûteuse. La partie suivante se concentre tout d'abord sur une description générale du principe de la photocatalyse, des divers photocatalyseurs existants et sur les principaux facteurs d'influence de la réaction. Par la suite, l'application du procédé pour l'inactivation de micro-organismes est présentée ainsi que son efficacité et ses mécanismes d'action.

1.3.1 Généralités

1.3.1.1 Principe

La photocatalyse est un cas particulier de la catalyse hétérogène. Il s'agit d'un procédé d'oxydation avancé (POA ou AOP - *Advanced Oxidation Process*) au cours duquel la formation d'entités chimiques très réactives va permettre de décomposer la matière organique environnante.

Le principe de la photocatalyse repose sur l'absorption d'un photon, issu d'une irradiation lumineuse, par une molécule ou un substrat photocatalytique et qui conduit à un état d'excitation électronique. Le processus peut avoir lieu en phase gazeuse, aqueuse ou au sein d'un liquide purement organique. Comme pour la catalyse hétérogène, il comprend cinq étapes principales (Herrmann, 2005) :

1. Transfert des réactifs du fluide (liquide ou gaz) vers la surface du photocatalyseur
2. Adsorption d'au moins un des réactifs
3. Réaction dans la phase adsorbée :
 - (a) Absorption de photons par le semi-conducteur
 - (b) Création de paires électrons-trous
 - (c) Réactions de transfert d'électrons
4. Désorption des produits
5. Départ des produits de l'interface

1.3.1.2 Description du phénomène

De manière générale, le processus de photocatalyse repose sur la théorie des bandes, qui consiste en la modélisation des valeurs d'énergie que peuvent prendre les électrons d'un solide (Figure 1.11). Les niveaux d'énergie permis sont classés en différents intervalles, ou **bandes internes**, comprenant la bande de conduction et la bande de valence. Les **bandes interdites** (GAP en anglais) constituent les valeurs d'énergie que les électrons d'un atome ne peuvent pas prendre. Selon la répartition des bandes d'énergie, cette théorie permet de schématiser les différences de comportement électrique entre un isolant, un semi-conducteur et un conducteur. Par convention, ils sont caractérisés par la largeur de leur bande interdite, égale à la différence entre les énergies de la bande de conduction et de la bande de valence. Les photocatalyseurs sont

situés dans la catégorie des semi-conducteurs, qui possèdent des bandes interdites relativement réduites. Ainsi, lors d'une irradiation lumineuse d'énergie suffisante, un photon d'énergie supérieure à l'énergie de la GAP est absorbé par le photocatalyseur et entraîne le "saut" d'un électron de la bande de valence vers la bande de conduction, provoquant par conséquent l'apparition d'un trou dans la bande de valence (appelé également lacune électronique). On décrit alors le phénomène comme la création d'une *paire électron-trou*, visible sur la figure 1.11.

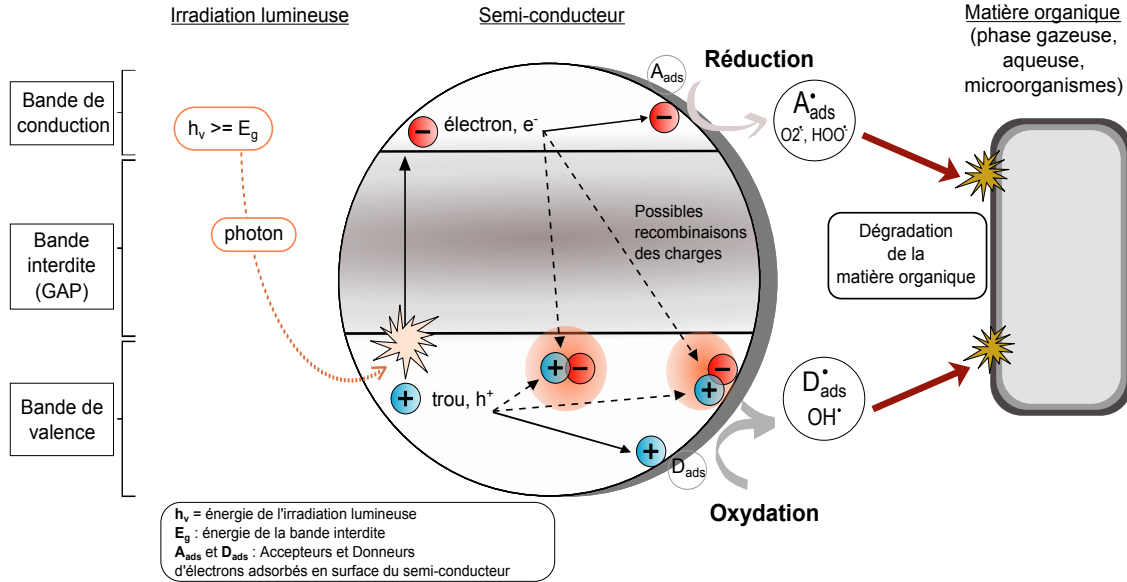
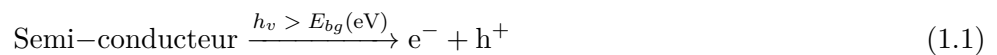


Figure 1.11 – Schéma de principe de la photocatalyse.

Les charges ainsi formées peuvent se recombiner (recombinaison en surface ou à l'intérieur du volume) pour redonner la neutralité au système et ainsi transformer l'énergie photoélectrique en énergie thermique (chaleur) ou bien migrer vers la surface afin de réagir avec les donneurs ou accepteurs d'électrons environnants, O_2 et H_2O par exemple, préalablement adsorbés par le semi-conducteur. Les réactions chimiques engendrées sont de nature oxydoréductrice et conduisent à la formation de radicaux libres d'une grande instabilité et pouvant intervenir dans un processus de dégradation de la matière organique adsorbée à la surface du photocatalyseur.

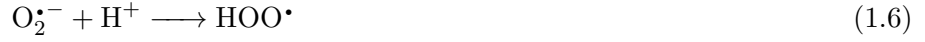
Les réactions illustrées par la figure 1.11 peuvent être décrites par les équations 1.1 à 1.3 suivantes :



Si les électrons-trous ne réagissent pas, ils peuvent se recombiner suivant la réaction 1.4



Lorsque les électrons réagissent avec le dioxygène, ils entraînent la formation de superoxydes qui, par la suite, peuvent aussi générer de nouveaux radicaux perhydroxyles $\text{HOO}\cdot^-$ et hydroxyles $\text{OH}\cdot^-$ selon les relations 1.5 à 1.8 suivantes :



Les trous réagissent avec les donneurs tels que l'eau, les ions HO^- ou les espèces organique, notés R, adsorbées en surface, visible sur les équations 1.9 à 1.11 :



D'après les équations précédentes, il convient de souligner l'action de la photocatalyse sur un environnement organique proche par deux moyens : (i) réactions directes avec les électron/trous à la surface du photocatalyseur, (ii) réactions indirectes, par le biais des radicaux hautement réactifs.

L'efficacité du processus photocatalytique est théoriquement définie comme le rendement quantique, c'est-à-dire le nombre d'évènements engendrés par l'absorption de photons. Les différents phénomènes qui le régissent sont de natures très complexes et font intervenir des paramètres difficilement mesurables tels que la dispersion photonique à la surface d'un semi-conducteur.

L'hypothèse de l'absorption de la totalité du rayonnement lumineux est souvent considérée dans la littérature (Linsebigler *et al.*, 1995) et l'activité est alors assimilée à la quantité de produits formés par oxydoréduction. Les divers facteurs qui vont réguler cette quantité de produits formés sont : l'énergie photonique incidente, la surface spécifique du photocatalyseur, sa nature, les espèces environnantes, les conditions hygrométriques, etc. Il est à noter que la recombinaison des charges à l'intérieur du photocatalyseur constitue, de manière générale, un véritable frein à l'efficacité photocatalytique.

1.3.1.3 Facteurs d'influence

Il existe une grande quantité de paramètres qui ont un impact sur le processus photocatalytique (Figure 1.12) (Beydoun *et al.*, 1999; Bhatkhande *et al.*, 2002; Fox et Dulay, 1993; Herrmann, 2005; Mills et Le Hunte, 1997). La liste des facteurs d'influence présentée ci-dessous

n'est pas exhaustive, elle se concentre essentiellement sur quatre paramètres majeurs : la bande d'énergie, la nature du photocatalyseur, la taille des particules et l'énergie photonique incidente.

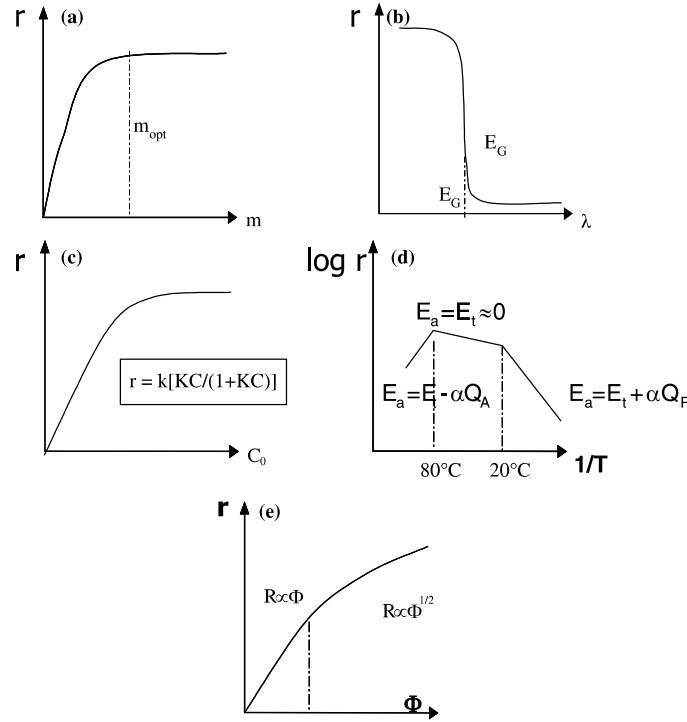


Figure 1.12 – Influence des différents paramètres physiques qui gouvernent la cinétique de la photocatalyse. Où r est le taux de réaction ; (a) masse du catalyseur ; (b) longueur d'onde ; (c) concentration initiale du réactif ; (d) température ; (e) flux énergétique. (Herrmann, 2005)

1.3.1.3.1 Bandes d'énergie :

Généralement, le pouvoir oxydoréducteur d'un semi-conducteur est d'autant plus grand que son GAP est grand. Plus précisément, les transferts de charges qui ont lieu entre un semi-conducteur et les espèces adsorbées en surface sont gouvernés par la position (l'énergie) des bandes du semi-conducteur et par le potentiel d'oxydoréduction des espèces adsorbées. Pour que ces transferts soient thermodynamiquement possibles, le potentiel des accepteurs doit être plus positif que le potentiel de la bande de conduction et le potentiel des donneurs doit être plus négatif que le potentiel de la bande de valence.

Pour donner un exemple, la figure 1.13 présente les positions des bandes d'énergie de plusieurs semi-conducteurs. L'échelle de gauche représente l'énergie interne tandis que l'échelle de droite affiche le potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode standard à hydrogène.

1.3.1.3.2 Nature du photocatalyseur :

Selon Bhatkhande *et al.* (2002), tout solide qui peut déclencher une réaction en présence de lumière et qui n'est pas consommé par l'ensemble des réactions est considéré comme un photocatalyseur. Les photocatalyseurs sont des semi-conducteurs particuliers. Toujours d'après Bhatkhande *et al.* (2002), le photocatalyseur idéal devrait être photo-réactif, activé par la lumière

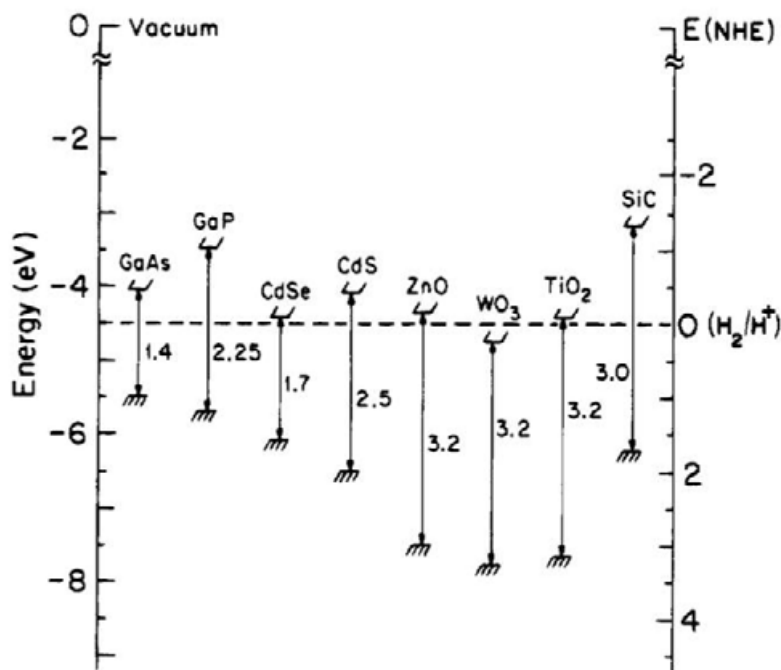


Figure 1.13 – Position des bandes d'énergie de différents semi-conducteurs (Linsebigler *et al.*, 1995)

visible et/ou proche UV, biologiquement et chimiquement inerte, photo-stable (c'est-à-dire non sujet à la photocorrosion), non toxique et enfin, bien évidemment, peu coûteux. Carp *et al.* (2004) rajoutent qu'il doit également générer des paires électrons-trous hautement énergétiques et qu'il doit avoir une durée de vie globale élevée.

Différents composés peuvent être utilisés comme photocatalyseurs (TiO_2 , ZnO , WO_3 , CdS , ZnS , SrTiO_3 , SnO_2 , WSe_2 , Fe_2O_3 , etc.) mais c'est le dioxyde de titane (TiO_2) qui est le plus utilisé. Il présenterait notamment les meilleures performances photocatalytiques et un rendement quantique toujours maximal (Herrmann, 2005).

Le dioxyde de titane (TiO_2) se trouve sous trois formes cristallographique : l'anatase et le rutile, de forme tétragonale, et la brookite, de forme orthorombique. L'anatase est moins stable thermiquement mais se forme à des températures plus faibles que les deux autres formes ($< 600^\circ\text{C}$), ce qui pourrait expliquer sa plus grande surface spécifique (Herrmann, 2005). C'est la seule forme qui possède des propriétés photocatalytiques. L'énergie de la bande interdite de l'anatase est de 3,2 eV, ce qui lui permet d'être activée par des photons de longueur d'onde d'environ 388 nm, rayonnement situé dans les ultraviolets. Certaines études font état d'une synergie entre anatase et rutile, au sein d'un photocatalyseur commercial contenant un mélange des deux formes dans certaines proportions (70-80 % anatase, 20-30 % rutile) (Agustina *et al.*, 2005; Ohno *et al.*, 2001, 2003). Ce phénomène serait à l'origine de la grande efficacité du produit, supérieure à celle obtenue avec l'anatase pure.

Il existe des photocatalyseurs qui sont dopés, selon différentes technologies, afin d'augmenter le spectre de longueur d'onde sur lequel ils sont normalement activés. Certains TiO_2 dopés sont ainsi activables par une lumière émise dans le spectre visible. Ces technologies sont encore en cours de développement et leur efficacité n'est généralement pas comparable aux photocataly-

seurs non-dopés.

Les figures 1.14 et 1.15 présentent les résultats d'abattement de NOx et NO de deux poudres de TiO₂ photocatalytiques commerciales, une poudre de TiO₂ conventionnelle (activable en UV) et une dopée, testées dans le cadre d'un projet de recherche portant sur la dépollution de l'air intérieur par photocatalyse (projet DAIP) mené au sein du LMDC (Dompoin *et al.*, 2013). La figure 1.14 présente les résultats sur les poudres de TiO₂ seules et la figure 1.15 présente les résultats obtenus avec les poudres de TiO₂ incluses dans une lasure. La lampe plein spectre est caractérisée par un rayonnement comparable au rayonnement solaire, avec une quantité d'UV similaire. Les lampes fluorescentes sont des tubes classiques, que l'on retrouve typiquement dans l'environnement intérieur mais qui contiennent une petite part d'UV (voir tableau 1.8, présentant les résultats d'irradiance de ces lampes pour différentes longueurs d'ondes dans les conditions d'essais).

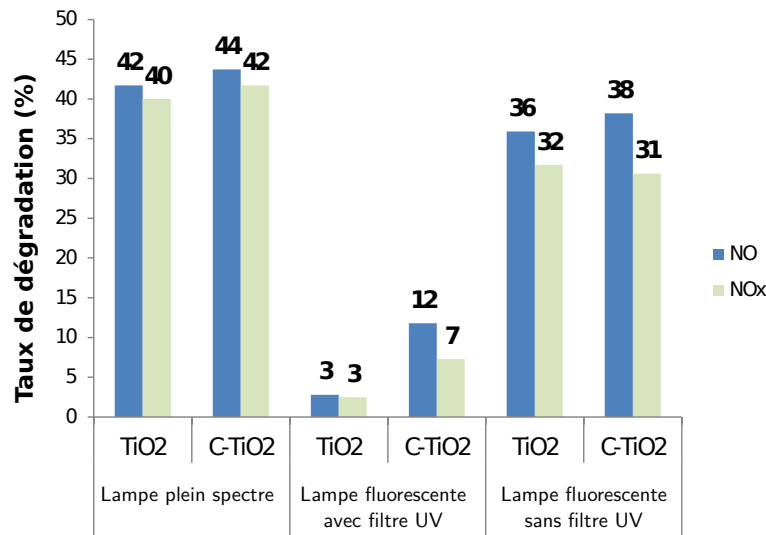


Figure 1.14 – Taux de dégradation obtenus sous différents illuminants pour les TiO₂ conventionnels ou dopés (C-TiO₂) dispersés dans de l'eau (Dompoin *et al.*, 2013).

Concernant les essais sur TiO₂ seuls (non inclus en lasure), les résultats indiquent des valeurs d'abattement similaires pour les deux types de dioxyde de titane (conventionnel et dopé). Une légère baisse d'efficacité est visible pour les essais avec la lampe fluorescente sans filtre UV.

Lorsque les UV sont filtrés, les deux photocatalyseurs donnent des valeurs d'abattement très faibles, inférieures à 12%.

Concernant les lasures photocatalytiques (Figure 1.15), la lasure formulée à base de TiO₂ conventionnel montre de meilleures performances lors de l'expérience avec la lampe plein spectre. Pour les deux lasures, on observe de fortes diminutions de l'abattement des gaz avec les lampes fluorescentes, même sans filtre UV.

Ainsi, les deux types de dioxyde de titane, conventionnel et dopé, ont des activités photocatalytiques similaires lorsqu'ils sont utilisés seuls. Lorsqu'ils sont inclus en lasure, le TiO₂ conventionnel montre des performances supérieures au TiO₂ dopé. Les deux TiO₂ montrent une diminution de l'efficacité lors d'une irradiation par lampe fluorescente classique.

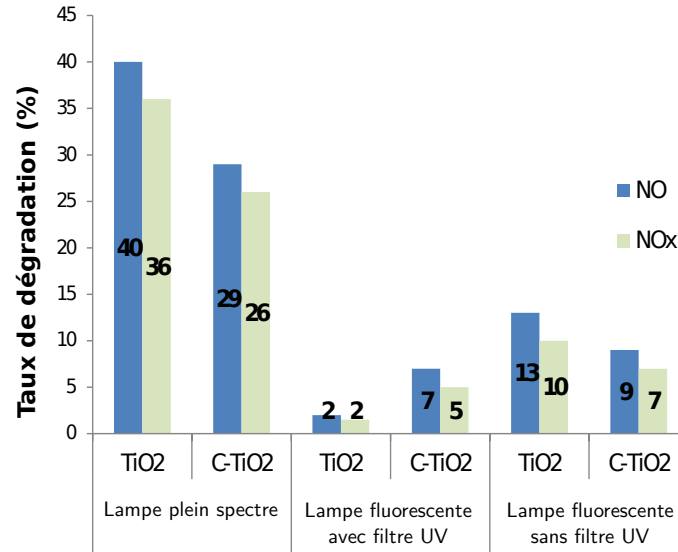


Figure 1.15 – Taux de dégradation obtenus sous différents illuminants pour les TiO₂ conventionnels ou dopés (C-TiO₂) formulés en lasures (Dompoin *et al.*, 2013).

Cette étude indique notamment que certaines techniques de dopage du dioxyde de titane, dans le but de le rendre activable par lumière visible, sont encore en développement. Pour la suite de l'étude, ces conclusions nous ont orienté vers le choix d'un photocatalyseur conventionnel, afin de s'assurer une efficacité optimale lors des essais mis en œuvre.

1.3.1.3.3 La taille des particules :

Elle a également une importance significative sur le rendement photocatalytique. Théoriquement, un ordre de grandeur nano-métrique permet d'obtenir des surfaces spécifiques relativement élevées, un potentiel oxydo-réducteur important et conduit, *de facto*, à une augmentation de l'activité du photocatalyseur. Une diminution de la taille des particules réduit notamment la probabilité de recombinaison de charges en volume. L'optimum, résultant d'une combinaison de facteurs opposés comme la surface spécifique, la dynamique des porteurs de charges et l'absorption lumineuse, varie selon les études de 10 à 14 nm (Kočí *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 1998) jusqu'à 40 nm (Almquist et Biswas, 2002).

1.3.1.3.4 L'énergie photonique :

Il a été montré que le rendement de la réaction photocatalytique augmentait proportionnellement au flux énergétique incident (Carp *et al.*, 2004; Herrmann, 2005). Intuitivement, plus l'énergie photonique apportée est élevée, plus grand est le taux de réaction. Jusqu'à environ 250 W/m², les paires électrons-trous sont consommées plus rapidement par réaction chimique que par recombinaison mais la recombinaison des charges devient dominante au-delà de cette valeur (Figure 1.12). Cette valeur est toutefois largement supérieure aux valeurs retrouvées en extérieur par journées ensoleillées, autour de 30 W/m² (Blöß et Elfenthal, 2007; Fujishima et Zhang, 2006) et par journées nuageuses, entre 5 et 10 W/m² (Hüsken *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2011).

A titre d'information, le tableau 1.8 présente différentes valeurs d'irradiance utilisées lors

d'essais d'inactivation photocatalytique en laboratoire et les valeurs d'irradiance mesurées en conditions réelles (à l'extérieur et à l'intérieur).

Irradiances utilisées en laboratoire		
Éclairement	Irradiance (W/m ²)	Réf.
lampe UV	4	(Sunada <i>et al.</i> , 1998)
lampe UV	10-15	(Sunada <i>et al.</i> , 2003)
lampe UV	10	(Kikuchi <i>et al.</i> , 1997)
lampe solaire	500-1000	(Gumy <i>et al.</i> , 2005)
Irradiances mesurées en conditions réelles		
Éclairement	Irradiance (W/m ²)	Réf.
ext. cond. ensoleillée	30	(Blöß et Elfenthal, 2007) (Fujishima et Zhang, 2006)
ext. cond. nuageuse	5-10	(Martinez <i>et al.</i> , 2011) (Hüsken <i>et al.</i> , 2009)
int. (néon classique)	0,3	(Dompont <i>et al.</i> , 2013)
int. (néon UV+visible)	4	(Dompont <i>et al.</i> , 2013)

Tableau 1.8 – Synthèse de valeurs d'irradiance généralement utilisées au cours d'essais d'abattement bactérien. Comparatif avec les valeurs d'irradiance mesurées en situation réelle en environnement extérieur (ext.), selon les conditions (cond.) d'ensoleillement, et intérieur (int.).

1.3.1.4 Applications du procédé photocatalytique

La photocatalyse présente un certain nombre d'avantages qui lui permettent d'envisager des applications à l'échelle industrielle. En effet, le catalyseur n'est pas consommé pendant la réaction, de nombreux composés organiques et inorganiques peuvent être décomposés ou transformés par oxydo-réduction, elle fonctionne à températures ambiantes, en phase gazeuse ou aqueuse, elle peut être activée par énergie solaire...

Les mécanismes réactionnels et les rendements des réactions photocatalytiques font l'objet de nombreuses recherches, qui souvent mettent en œuvre des particules photocatalytiques de TiO₂. En outre, le TiO₂ illuminé présente un caractère superhydrophile, favorisant son usage dans la mise en œuvre de matériaux aux propriétés autonettoyantes. Concernant l'utilisation de la photocatalyse comme agent dépolluant, différents types d'application sont développés selon les cibles visées : gaz, liquides ou micro-organismes.

Beaucoup d'études sont par ailleurs orientées vers l'assainissement d'eaux usées et d'effluents au moyen de réacteurs photocatalytiques mis en œuvre en milieux aqueux (Carp *et al.*, 2004; Joanne Gamage et Zisheng Zhang, 2010).

Dans le génie civil, divers produits à base de TiO₂ ont été développés pour lutter contre les salissures biologiques (algues, champignons...) ou pour la dépollution de l'air ambiant (COV, NOx...). Certains travaux explorent le potentiel dépolluant de matrices cimentaires incorporants du TiO₂ (Cassar et Pepe, 2002; Chen et Poon, 2009; Giannantonio *et al.*, 2008; Lackhoff *et al.*,

2003; Ruot *et al.*, 2009). D'autres concernent le développement de revêtements photocatalytiques (Chen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2014, 2011). Les travaux de Martinez *et al.* ont permis de développer des lasures photocatalytiques, où des nanoparticules de TiO_2 sont incluses dans une matrice d'eau et d'acrylique. Ils ont montré l'efficacité de ces revêtements sur la réduction des concentrations de NO_x et de COV dans l'air sous diverses conditions environnementales (humidité relative, concentration de gaz polluants, etc.). Ces résultats encouragent la mise en place de tests pour évaluer les performances antimicrobiennes des lasures.

1.3.2 La photocatalyse appliquée à la désinfection

Parmi les espèces réactives générées par le processus photocatalytique, les oxydants sont considérés comme des agents antimicrobiens à action létale non spécifique⁹, généralement caractérisés par un large spectre d'activité et une action rapide et non rémanente¹⁰ (Allion, 2004). Un nombre important de travaux a été publié sur l'effet de nanoparticules de TiO_2 photocatalytiques sur les micro-organismes (Carp *et al.*, 2004; Chong *et al.*, 2010; Dalrymple *et al.*, 2010; Foster *et al.*, 2011; Joanne Gamage et Zisheng Zhang, 2010; Martinez *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2012). Ces études révèlent son efficacité sur une large gamme d'organismes, incluant des bactéries à Gram négatif/positif, des endospores, des *fungi*, des algues, des protozoaires, des virus et des prions (montrés comme les plus résistants aux désinfectants (Taylor, 2008)) ainsi que des toxines microbiennes.

Une classification de l'efficacité de la photocatalyse en fonction de l'activité relative a été proposée dans la littérature par Sayilkan *et al.* (2009). Les auteurs ont défini quatre gammes d'efficacité :

- 0-20% : pas d'effet bactéricide ;
- 20-50% : effet faible ;
- 50-70% : effet manifeste ;
- >70% : effet puissant.

En excluant les facteurs d'influence du processus photocatalytique en lui-même (source lumineuse, taille des particules, etc.), on peut s'attendre à voir varier la résistance des micro-organismes à la photocatalyse selon la constitution de leur structure externe et leur capacité à se protéger d'un stress oxydatif.

Les bactéries à Gram positif par exemple, possèdent une épaisse couche de peptidoglycane (CF partie 1.2.1.2) leur offrant une meilleure résistance que celle des bactéries à Gram négatif. Plusieurs chercheurs ont ainsi observé une meilleure résistance de certaines bactéries à Gram positif vis-à-vis du processus photocatalytique que certaines bactéries à Gram négatif (Chung *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2003; Lydakis-Simantiris *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2005, 2007). Cette résistance se traduit par une augmentation du temps de traitement pour arriver à une destruction. Cependant, de part l'immense diversité des micro-organismes, de leur structure et de leur réponse face à une agression, il est difficile d'indexer un comportement spécifique sur un ensemble d'individus. Les études peuvent indiquer des observations contradictoires : selon Russell (1999) par exemple, les bactérie à Gram négatif sont généralement plus résistantes que les *cocci*

9. qui ne cible pas d'organisme particulier

10. temporaire, qui ne subsiste pas dans le temps

à Gram positif. D'autres études montrent également des bactéries à Gram positif plus sensibles à la photocatalyse. Matsunaga *et al.* (1985) rapportent une perte de viabilité plus rapide chez *Lactobacillus acidophilus* (Gram +) que chez *Escherichia coli* (Gram -) ; les deux micro-organismes perdant néanmoins toute viabilité après 120 minutes dans les conditions de l'étude, c'est-à-dire en suspension aqueuse, avec un photocatalyseur TiO_2/Pt illuminé par des lampes 300-500 W. L'étude de Luo *et al.* (2008) met en évidence à la fois une plus grande résistance de *Enterococcus faecalis* (Gram +) par rapport à *E. coli* mais une plus grande sensibilité que *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -). Le nombre de cellules bactériennes de *P. aeruginosa* augmente même après un certain laps de temps (Figure 1.16). Les auteurs expliquent que l'ajout de dioxygène dans le système au cours de l'expérience permet à ces bactéries, strictement aérobies, de se multiplier plus rapidement. A partir de ce point d'inflexion, la vitesse de multiplication bactérienne devient supérieure à la cinétique de destruction.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'épaisseur et la structure de la paroi qui protège les bactéries, bien que jouant un rôle déterminant, ne sont pas les seuls facteurs de résistance microbienne face à la photocatalyse. De manière générale, des conclusions définitives sont difficiles à établir sur la totalité des mécanismes impliqués. Certains micro-organismes disposent de moyens de défense face au stress oxydatif, comme pour *E. coli* (Gogniat, 2006). Ces cellules sont capables, dans une certaine mesure, de prévenir la formation voire de dégrader directement les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) au moyen de réactions enzymatiques spécifiques. Dans leur étude, Goulhen-Chollet *et al.* (2009) avancent néanmoins que l'apparition d'un mécanisme de résistance est quasiment impossible face à ce type d'attaque : du fait de la non sélectivité du processus de désinfection photocatalytique, les protéines à l'origine de ces mécanismes "défensifs" peuvent être dégradées rapidement.

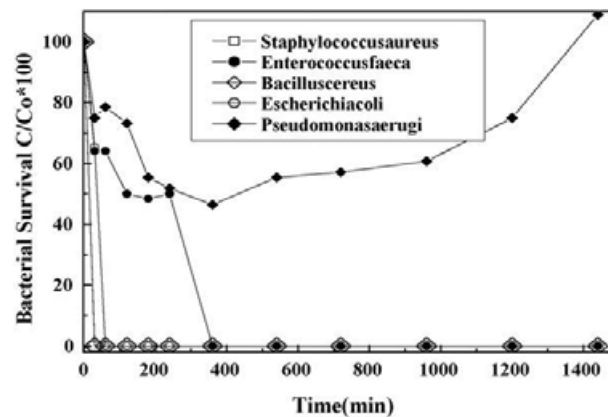


Figure 1.16 – Cinétique de survie de micro-organismes par photocatalyse de TiO_2 (Luo *et al.*, 2008)

1.3.2.1 Mécanismes et facteurs d'influence

Il est important de noter que la grande majorité des travaux sur la photocatalyse antimicrobienne est réalisée en milieux aqueux. L'épuration microbienne de l'air ambiant, rendue difficile par la complexité de mise en œuvre, est relativement peu étudiée (Faure, 2010). L'étude statique des mécanismes en milieux aqueux permet une approche plus aisée des phénomènes, bien que

l'appréhension totale et complète des mécanismes en jeu lors de l'inactivation microbienne par photocatalyse reste encore à ce jour relativement confuse.

Sur la base de multiples études sur *E. coli* et d'autres micro-organismes, l'effet biocide est principalement attribué à l'action des multiples DRO tels que HO^\bullet , H_2O_2 et $\text{O}_2^{\bullet-}$, générés par l'illumination du TiO_2 . Les radicaux HO^\bullet sont proposés comme principaux responsables de la mort cellulaire par plusieurs auteurs (Cho et Yoon, 2008; Ireland *et al.*, 1993; Kikuchi *et al.*, 1997; Maness *et al.*, 1999). L'étude de Kikuchi *et al.* (1997) met également en avant le rôle de H_2O_2 dans le processus. En quantifiant les peroxydes d'hydrogène par colorimétrie, ils mesurent les effets d'un film de TiO_2 illuminé sur une suspension microbienne. Deux essais sont réalisés : dans le premier, la suspension est déposée sous forme de goutte directement sur le film de TiO_2 , dans le deuxième, la suspension est séparée du film par une membrane PTFE. Les résultats indiquent que HO^\bullet et H_2O_2 sont tous deux responsables de la mort cellulaire à proximité du TiO_2 mais seuls les radicaux H_2O_2 semblent responsables de la mort cellulaire dans la deuxième expérience. La forte réactivité des HO^\bullet réduit considérablement leur durée de vie et les empêche de diffuser trop loin de la surface du TiO_2 (quelques μm), surtout en présence d'autres matières potentiellement oxydables. Deux modes d'actions sont attribués au peroxyde d'hydrogène selon sa concentration : (i) pour des concentrations inférieures à 2 mmol/l l'action bactéricide est imputée à des réactions d'oxydation en chaîne avec le métabolisme bactérien ; (ii) pour des concentrations supérieures à 10 mmol/l, l'effet bactéricide est attribué aux HO^\bullet formés par réaction de Fenton (Imlay et Linn, 1986).

D'autres auteurs pointent également la possible photolyse directe de H_2O_2 et de l'eau sur la production de radicaux hydroxyles par irradiation UV (Yan *et al.*, 2009).

Le mode d'action bactéricide de la photocatalyse du TiO_2 est étudié depuis les travaux de Matsunaga dans les années 80, dans lesquels les auteurs suggèrent que la mort de la cellule est induite par l'oxydation des coenzymes A, conduisant à l'arrêt de la respiration cellulaire (Matsunaga *et al.*, 1985). Il semblerait cependant aujourd'hui que l'action létale de la photocatalyse sur les micro-organismes soit due aux multiples dommages que subissent la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique (Foster *et al.*, 2011). Les travaux de Sunada *et al.* (1998, 2003) sur *E. coli* (Gram -) proposent un mécanisme d'attaque de la cellule en trois étapes, schématisées sur la figure 1.17 :

1. Attaque de la membrane externe (lipopolysaccharide - LPS et phospholipides) : pas de perte de viabilité, augmentation de la perméabilité aux espèces réactives
2. Pénétration des espèces réactives à travers la couche de peptidoglycane
3. Attaque de la membrane plasmique (phospholipides) par les espèces réactives :
 - Peroxydation des lipides membranaires et perte d'activité respiratoire
 - Désordre structurel et fonctionnel de la membrane plasmique, éventuelle fuite du matériel intracellulaire
 - Perte de viabilité de la cellule ; mort cellulaire

Un certain nombre d'études a permis d'étayer les divers mécanismes de dégradation cellulaire bien que certaines parties restent à ce jour relativement confuses.

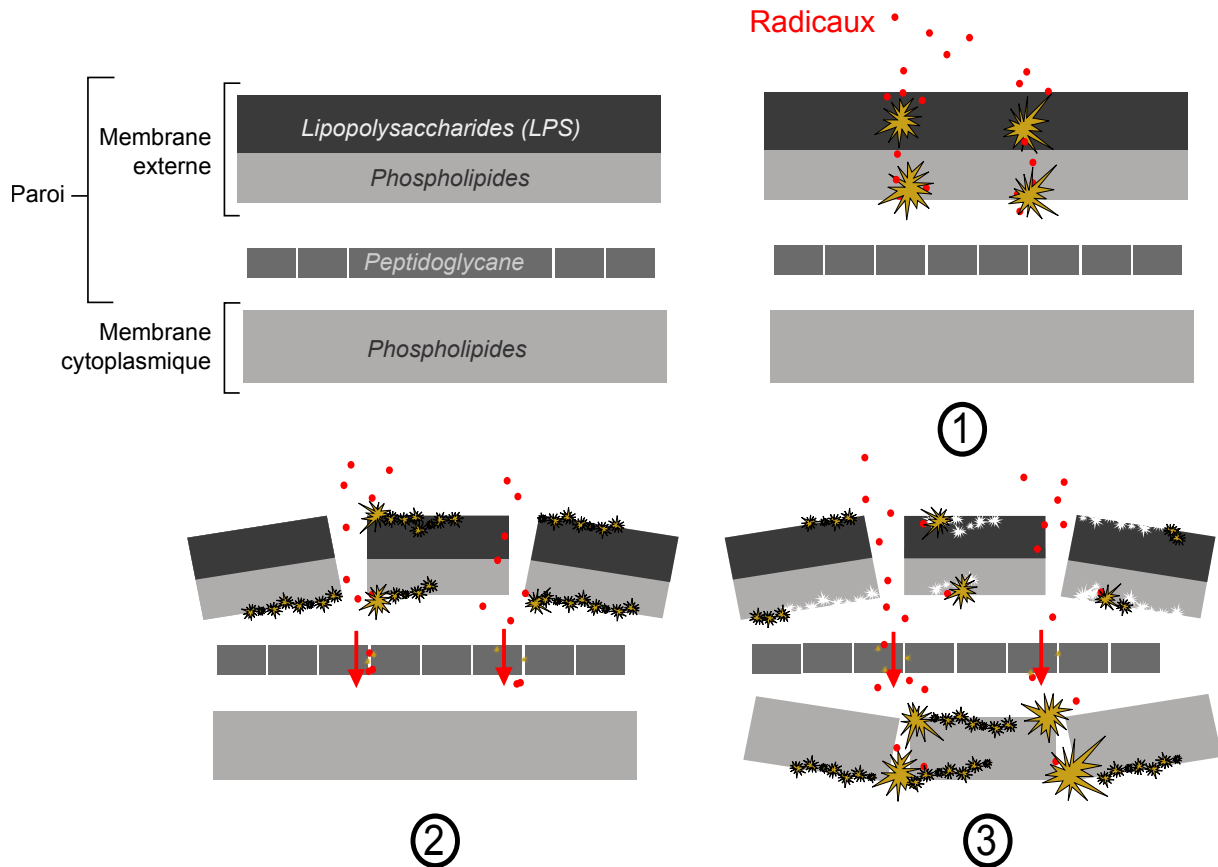


Figure 1.17 – Schéma du mode d'attaque des radicaux sur une paroi bactérienne Gram -. Figure adaptée de Sunada *et al.* (2003). (1) attaque de la paroi cellulaire, (2) pénétration des espèces réactives à travers le peptidoglycane, et (3) attaque de la membrane plasmique.

L'augmentation de la perméabilité cellulaire a été observée indirectement par mesure de la fuite d'ions K^+ par Saito *et al.* (1992) sur *Streptococcus sobrinus* AHT et par Lu *et al.* (2003) et Hu *et al.* (2007) sur *E. coli*. Dans leurs travaux, Huang *et al.* (2000) ont réalisé des mesures de perméabilité aux petites molécules telle que l'ONPG¹¹ et de fuite de plus grosses molécules telle que la β -D-galactosidase après quelques minutes de traitement sur *E. coli*. L'étude de Gogniat *et al.* (2006) montre également cette augmentation de la perméabilité membranaire par cytométrie de flux en utilisant une combinaison de deux marqueurs fluorochromes intercalants de l'ADN, l'un pouvant diffuser à travers une membrane intacte (Sybr Green II) et l'autre ne pouvant passer qu'à travers des membranes lésées. Un certain nombre d'études a également confirmé les dommages engendrés sur la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique de différentes bactéries par observations au MEB et/ou au MET, notamment visibles sur la figure 1.18 (Chung *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 1992; Sunada *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2010, 2009).

Concernant les bactéries à Gram négatif, le LPS, constitué d'acides gras sensibles à la peroxydation, est la première cible des radicaux. Le LPS correspondant aux endotoxines bactériennes, son altération conduit également à la neutralisation des effets toxiques de la bactérie, même après son inactivation (Sunada *et al.*, 1998).

Les phospholipides sont également très sensibles à la peroxydation, en particulier les lipides

11. *o*-nitrophenol β -D-galactopyranosideside

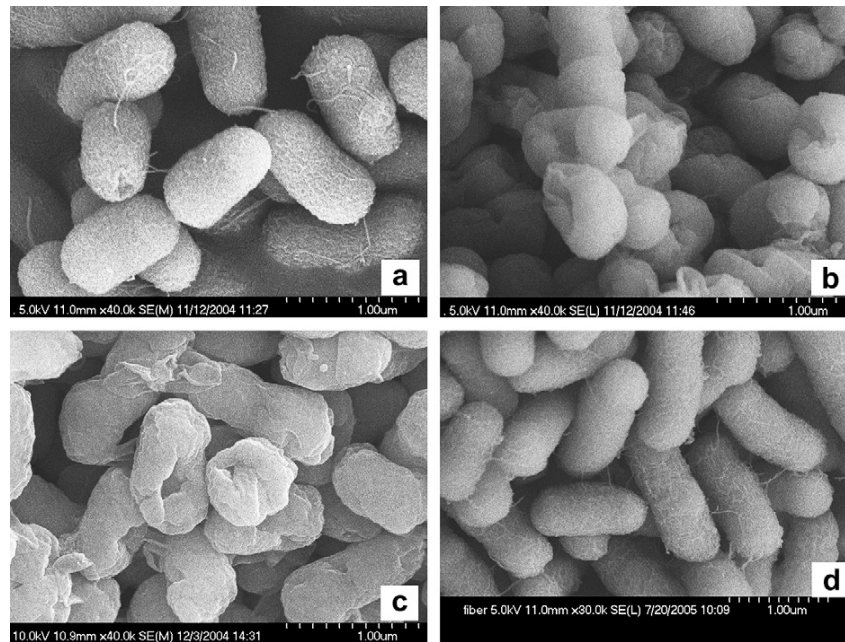


Figure 1.18 – Clichés MEB de cellules d'*E.coli* (a) non traitées; (b) et (c) après 2h de traitement photocatalytique, et (d) après 30min de traitement photocatalytique (Wu *et al.*, 2010)

insaturés. Les travaux de Maness *et al.* (1999) ont montré pour la première fois la peroxydation des lipides membranaires due à l'action de la photocatalyse par mesure du relargage de malondialdéhyde (MDA), composé chimique utilisé comme indice diagnostique de la peroxydation lipidique, en parallèle à la perte d'activité respiratoire par mesure de la réduction de chlorure de 2,3,5-triphenyltetrazolium. D'autres auteurs ont par la suite confirmé ces observations (Cheng *et al.*, 2007; Nadtochenko *et al.*, 2006). Face aux attaques oxydatives, la réaction des acides gras insaturés avec les DRO en présence d'oxygène entraîne la formation de nouveaux radicaux peroxydes, créant ainsi des réactions en chaînes qui peuvent induire de nombreux dommages à la cellule, parfois sur des sites très éloignés des premières attaques (Dalrymple *et al.*, 2010). Bien que la corrélation entre le taux de peroxydation des lipides et l'inactivation des cellules soit encore incertaine, l'étude de Cheng *et al.* (2007) sur différents acides gras de *Legionella pneumophila* a permis de mettre en avant le caractère déterminant de la composition des acides dans la sensibilité des cellules bactériennes au traitement par photocatalyse.

Très peu de travaux se sont concentrés sur la couche de peptidoglycane. Les mécanismes qui s'y produisent restent encore mal élucidés à ce jour. Les observations de Lu *et al.* (2003) au microscope à force atomique ont montré que la couche de peptidoglycane pouvait subir des dommages induits par les radicaux. On sait également qu'il s'agit d'une couche très poreuse permettant la pénétration de particules autour de 2 nm (Demchick et Koch, 1996). La littérature s'accorde bien sur le rôle "retardateur" de la couche de peptidoglycane contre la désinfection photocatalytique même si aucune conclusion définitive n'a été établie.

Des dommages sur le matériel intracellulaire ont également été rapportés, notamment au niveau de l'ADN (Gogniat et Dukan, 2007; Yao *et al.*, 2007). Plusieurs auteurs font état de la minéralisation totale ou de la destruction totale de cellules bactériennes après une période de traitement suffisante (Greist *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008; Nadtochenko *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1994).

1.3.2.2 Facteurs d'influence du processus photocatalytique pour la dégradation des micro-organismes

En plus des facteurs d'influence intrinsèques au catalyseur ou aux espèces impliquées, les recherches sur le sujet pointent l'impact de deux facteurs majeurs sur l'efficacité bactéricide :

Le contact avec les cellules bactériennes : les études montrent une corrélation entre le taux d'adsorption sur TiO_2 et le taux d'inactivation cellulaire (Foster *et al.*, 2011; Gogniat, 2006). Le contact direct favorise l'oxydation des cellules par les trous en surface du photocatalyseur (Nadtochenko *et al.*, 2006, 2008) et réduit la compétition avec d'autres espèces organiques oxydables (Cho *et al.*, 2005). En outre, un contact prolongé pourrait entraîner des dommages physiques aux cellules lorsque le TiO_2 est hautement cristallin (Caballero *et al.*, 2009). Au cours d'une étude sur la désinfection par photocatalyse de cellules malignes HeLa, Cai *et al.* (1991) observent une diminution du nombre de cellules en contact avec du TiO_2 et maintenues dans le noir pendant 24h. Des clichés au microscope électronique à transmission révèlent la présence de particules à l'intérieur de la cellule. La cytotoxicité des nanoparticules non irradiées pourrait être induite par un phénomène de phagocytose¹².

La phase aqueuse : plusieurs paramètres relatifs à la phase aqueuse dans laquelle a lieu la réaction ont un effet sur l'efficacité du traitement photocatalytique : la présence de matière organique ou d'ions en suspension, venant monopoliser les radicaux ou s'adsorber sur les sites actifs du TiO_2 à la place des bactéries (Carp *et al.*, 2004; Dunlop *et al.*, 2001); le pH de la solution, modifiant les propriétés de surface du TiO_2 (Gumy *et al.*, 2006; Rincón et Pulgarin, 2004); la concentration bactérienne, réduisant l'efficacité bactéricide (figure 1.19)

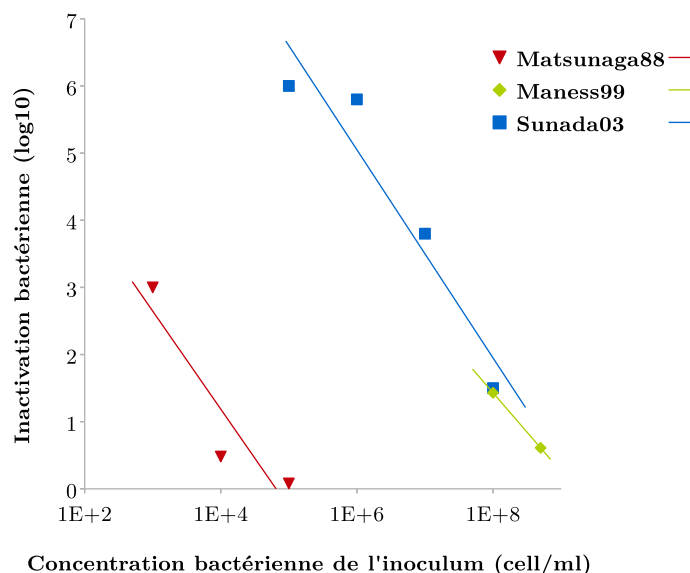


Figure 1.19 – Evolution de l'inactivation d'*E. coli* en fonction de la concentration bactérienne initiale. Synthèse des travaux de Maness *et al.* (1999); Matsunaga *et al.* (1988); Sunada *et al.* (2003)

12. Mécanisme d'ingestion de particules étrangères à la cellule.

1.3.2.3 Mise en oeuvre du photocatalyseur

Comme expliqué dans la partie 1.3.1.4 précédente, divers moyens de mise en oeuvre ont été envisagés pour l'application de la photocatalyse. En effet, le photocatalyseur peut être mis en place sous forme de particules libres, en suspension dans un milieu aqueux, ou fixées à un support. Le premier cas présente des limitations du fait d'une étape supplémentaire de séparation ou de récupération des particules à partir du milieu dépollué.

L'immobilisation du photocatalyseur est nécessaire dans le cadre de la dépollution de l'air ambiant. Différents procédés de fixation sont utilisés (Bideau *et al.*, 1995; Byrne *et al.*, 1998). On retrouve des méthodes de trempage-retrait, visant à imprégner le support directement dans une dispersion de nanoparticules de TiO_2 et comprenant une étape de fixation par calcination (Sunada *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1994); les méthodes chimiques sol-gel qui utilisent le principe de polymérisation mais nécessitent généralement du titane isopropoxyde (Kikuchi *et al.*, 1997; Özyildiz *et al.*, 2014), les méthodes chimiques en phase vapeur (Mungkalasiri *et al.*, 2014, 2010); ou encore des méthodes par électrophorèse, centrifugation ou plus simplement par sédimentation. Ces procédés sont néanmoins utilisés à l'échelle de laboratoire, sur de petits supports ou sur des réacteurs de taille relativement moyenne qui sont difficilement envisageable à l'échelle des matériaux de construction.

Pour des applications dans le Génie Civil, l'inclusion de particules photocatalytiques dans des peintures ou des lasures a déjà montré des propriétés d'assainissement de l'air ambiant en laboratoire et en situation réelle (Allen *et al.*, 2005, 2008; Martinez *et al.*, 2014, 2011) et permet ainsi d'envisager cette méthode de mise en oeuvre pour la dépollution biologique de grandes surfaces intérieures. Cette technique enferme les nanoparticules dans une matrice liante. Une vigilance particulière doit ainsi être portée à (i) l'éventuelle réduction d'efficacité imputée à l'encapsulation des particules et (ii) la résistance suffisante du liant lui-même face au processus photocatalytique en lui même.

1.3.3 Conclusion

Le principe de la photocatalyse repose sur l'irradiation d'un semi-conducteur par une source lumineuse d'énergie suffisante pour permettre la création de paires électron-trou. Après migration des charges en surface, les réactions d'oxydoréduction avec des molécules adsorbées sur le semi-conducteur (H_2O , O_2) vont entraîner la formation d'espèces chimiques instables (Dérivés Réactifs de l'Oxygène) qui vont intervenir dans les processus de dégradation de la matière organique environnante (eau, air, micro-organismes, etc.)

Le dioxyde de titane, par sa disponibilité, son activation proche du rayonnement visible et son efficacité, est le photocatalyseur le plus étudié et le plus utilisé. Le dopage du dioxyde de titane (par des ions métalliques par exemple) lui permet même d'être activé par un rayonnement visible et donc d'être utilisable en environnement intérieur. Cependant, les photocatalyseurs dopés sont encore en phase de développement. Certains ne montrent pas des efficacités aussi élevées que les photocatalyseurs conventionnels.

De par son action oxydante non sélective, le processus photocatalytique permet théoriquement la dégradation d'un large spectre de micro-organismes et une action rapide et non rémanente. Certains facteurs d'influence de l'activité photocatalytique sur les microorganismes ont été documentés.

Les études traitant de la photocatalyse bactéricide ont mis en évidence une efficacité bactéricide sur différents micro-organismes pour des intensités lumineuses relativement élevées, près de 10 W/m^2 , et parfois même au-delà des intensités d'usage quotidien, jusqu'à 500 W/m^2 , avec des longueurs d'ondes de photons habituellement comprises entre 300 et 400 nm. À notre connaissance, aucune étude ne rapporte de telles valeurs d'inactivation avec une intensité lumineuse plus faible, qui s'apparenterait réellement à un dispositif photocatalytique passif avec des conditions d'éclairement que l'on retrouve dans un environnement réel.

En outre, ces essais sont le plus souvent réalisés avec du TiO_2 fixé par un procédé complexe, requérant des compétences et du matériel particuliers. Des dispositifs passifs sous forme de lasures photocatalytiques ont peu été étudiés, bien qu'ils soient simples à mettre en œuvre et aient déjà montré leur efficacité sur la réduction des émissions de COV et NOx dans l'air ambiant.

D'autres réponses sont également envisageables pour la protection des matériaux de construction contre la prolifération microbienne. Dans un contexte de qualité de l'air intérieur, il est intéressant de se tourner vers des solutions bio-sourcées. Les molécules d'ester de glycérol, sous-produits issus de l'agro-industrie, possèdent notamment des propriétés particulières vis-à-vis de l'eau et un caractère antimicrobien naturel, leur permettant d'être sérieusement considérées comme une réponse potentielle à la problématique de prolifération microbienne.

1.4 Valorisation de monoglycérides bio-sourcés aux propriétés antimicrobiennes

Le glycérol est un sous-produit issu de l'agro-industrie, notamment de la fabrication de savon, de biocarburant, de certains alcools... Son utilisation répond également à une production industrielle de masse, excédentaire par rapport aux débouchés actuels. L'incorporation de ce type de molécules à des revêtements de surface aux propriétés antimicrobiennes est donc une idée innovante, peu coûteuse et s'inscrivant dans une démarche éco-responsable de revalorisation de déchets bio-sourcés. Les molécules à base de glycérol possèdent naturellement des propriétés spécifiques vis-à-vis de l'eau qui les rendent intéressantes pour les matériaux cimentaires. Du fait de leurs propriétés hygroscopiques et tensioactives, elle peuvent être utilisées dans de nombreuses autres applications.

1.4.1 Généralités sur les esters de glycérol

Le glycérol est une molécule aux propriétés hygroscopiques et tensioactives, retrouvée dans les graisses, les huiles et les phospholipides. Le glycérol peut être extrait à partir de déchets issus de la production de matières biologiques comme le maïs et le colza. C'est également un sous-produit issu de la transestérification d'huiles végétales lors de la production de biodiesel (Koseoglu, 2006). Les propriétés particulières des dérivés du glycérol présentent un intérêt certain pour différents secteurs de l'industrie tels que les cosmétiques, l'alimentation, les médicaments, le textile...

Les monoglycérides (ou monoacylglycérol - MAG) sont des molécules qui comprennent un résidu d'acide gras lié à un résidu de glycérol par une liaison ester (figure 1.20). Les mono- et diglycérides d'acides gras sont largement répandus dans l'industrie alimentaire (sous la dénomination **E741**) en tant qu'émulsifiant et agent de texture principalement. Ils peuvent être synthétisé par réaction d'estérification entre le glycérol et un acide carboxylique, produisant une nouvelle molécule aux propriétés tensioactives. D'autres voies de synthèses sont possibles.

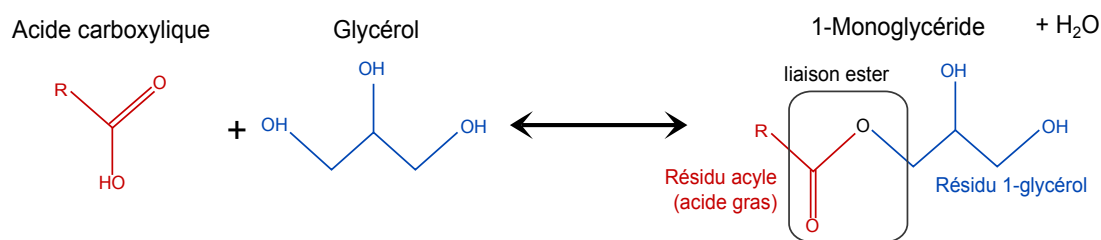


Figure 1.20 – Réaction d'estérification du glycérol : cas général et réaction avec acide undécylénique

1.4.2 Activité antimicrobienne des acides gras et de leurs esters

Depuis de nombreuses années les acides gras et leurs esters sont utilisés pour leur propriétés antimicrobiennes. Leur efficacité a été montrée contre une large gamme de microorganismes, incluant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, des levures, des champignons et des virus (Desbois et Smith, 2009). Cette activité antimicrobienne, microbicide et/ou inhibitrice

de croissance, est principalement gouvernée par la structure et la forme des molécules, i.e. la longueur de la chaîne carbonée et la présence de doubles liaisons (saturé/insaturé).

Les résultats de la littérature sont parfois contrastés, vraisemblablement du fait des diverses méthodologies employées, mais des tendances générales émergent quant aux facteurs d'influence et aux mécanismes de l'activité antimicrobienne de ces produits.

De manière générale, les études montrent que les chaînes moyennes sont plus efficaces contre les micro-organismes (Isaacs *et al.*, 1995; Kabara *et al.*, 1977; Thormar *et al.*, 1987). Dans leur état de l'art sur l'activité antimicrobienne d'acides gras et esters, Shibasaki et Kato (1978) soulignent que l'activité gagne en intensité avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbone jusqu'à 12. Isaacs *et al.* (1995) ont travaillé sur l'effet de molécules d'acides gras et d'esters sur virus et bactéries en milieux complexes (lait bovin, humain, et préparation pour nourrissons). Leurs résultats montrent également que les chaînes supérieures à 12 atomes sont moins efficaces. Selon les auteurs, l'activité élevée des chaînes moyennes pourrait être attribuée d'une part à la solubilité aqueuse des acides gras possédant des chaînes de petites tailles et, d'autre part, au fait que les chaînes plus longues peuvent se lier aux protéines (comme l'albumine) présentes dans ces milieux et ainsi devenir moins disponibles pour réagir avec les micro-organismes.

Une corrélation a été observée entre le nombre de doubles liaisons et l'activité (Doležalová *et al.*, 2010; Knapp et Melly, 1986; Saito *et al.*, 1984) : les molécules insaturées montrent une plus grande efficacité que les molécules saturées pour une même longueur de chaîne, sur des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Kabara *et al.*, 1972) ainsi que sur champignons (Doležalová *et al.*, 2010). De même, l'estérification des acides donnerait généralement des produits plus réactifs (Isaacs *et al.*, 1995; Kabara *et al.*, 1977; Kato et Arima, 1971) avec des efficacités similaires pour des concentrations en ester jusqu'à 10 fois plus faibles que pour les acides (Thormar *et al.*, 1987).

En outre, l'ensemble des résultats de la littérature révèle que la majorité des acides gras et de leurs esters sont plus efficaces contre les bactéries à Gram positif et les levures que contre les bactéries à Gram négatif (Galbraith et Miller, 1973; Kabara *et al.*, 1977; Kodicek et Worden, 1945; Miller *et al.*, 1977; Růžicka *et al.*, 2003; Shibasaki et Kato, 1978; Valentin *et al.*, 2012). Cette conclusion est également soulignée par Bergsson *et al.* (2002) qui ont évalué l'activité antibactérienne de divers monoglycérides sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ils expliquent que la surface hydrophile de la majorité des bactéries à Gram négatif (tête O des chaînes LPS), la faible fluidité des chaînes hydrocarbonées de LPS ainsi que les fortes interactions latérales entre les molécules de LPS freinent la pénétration des molécules hydrophobes (comme les lipides) dans la double couche cellulaire. Cependant, les bactéries à Gram négatif possédant des surfaces à caractère hydrophobes¹³ sont plus facilement inactivées par les acides gras et monoglycérides (Bergsson *et al.*, 2002).

1.4.3 Mécanismes d'action

L'action des acides gras et des esters au niveau de la membrane plasmique des cellules est documentée, bien que l'ensemble des mécanismes d'action en jeu sont encore mal connus. Certains

13. La paroi externe de ces bactéries n'est pas formée de LPS mais de LOS, lipo-oligosaccharides (Preston *et al.*, 1996).

effets préjudiciables peuvent être attribués aux propriétés détergentes en raison de leur structure amphiphile. Kabara *et al.* (1977) suggèrent différents acteurs de la perturbation de la fluidité membranaire : des composés lipophiles à longueurs de chaîne spécifiques, l'insaturation¹⁴ et de certains groupes fonctionnels hydrophiles. Les observations au MEB et MET de Thormar *et al.* (1987) et Bergsson *et al.* (1998, 2001) montrent la désintégration de la membrane cytoplasmique sans grands changements sur la paroi cellulaire et la forme générale (figure 1.21).

Les conclusions des travaux de Bergsson *et al.* (2001) suggèrent la pénétration de la monocaprine à travers la couche de peptidoglycane sans provoquer de modifications significatives. En outre, la différence entre l'activité sur *S. aureus* et l'activité sur streptocoques serait imputable aux différences de réticulation des polymères de peptidoglycane. Au niveau de la membrane plasmique, un nombre important d'études fait état d'interférence avec la chaîne de transport des électrons affectant la phosphorylation oxydative (voie métabolique dans la production d'énergie) ou d'autres protéines impliquées dans le transport de certains composés à l'intérieur de la cellule (Galbraith et Miller, 1973; Miller *et al.*, 1977; Sheu et Freese, 1972).

Desbois et Smith (2009) listent également d'autres processus relatifs à l'action des acides gras et des esters qui contribuent à la mort ou à l'inhibition de la croissance bactérienne : l'inhibition de l'activité enzymatique, l'altération de l'absorption de nutriments, la génération de peroxydation toxique et de produits oxydants (auto-oxydation) et la lyse cellulaire.

1.4.4 Résistance bactérienne

De la même façon que pour le stress oxydatif provoqué par la photocatalyse, les micro-organismes disposent de moyens de défense actifs ou passifs vis-à-vis des agressions extérieures. Comme détaillé précédemment, les chercheurs font état d'une plus grande résistance des bactéries à Gram-négatif vraisemblablement expliquée par la plus grande complexité de leur paroi (Kabara *et al.*, 1977).

D'autres mécanismes ont été observés dans la mise en place de stratégies de défense des bactéries. Clarke *et al.* (2007) ont observé la production d'une protéine de surface (lsdA) chez *S. aureus* qui a pour effet de diminuer l'hydrophobicité des bactéries, les rendant résistantes à des acides cutanés à action antimicrobienne. Le phénomène a également été observé par Kenny *et al.* (2009). La présence de caroténoïdes sur certains emplacements de la membrane permettrait également de stabiliser la membrane par diminution de sa fluidité (Desbois et Smith, 2009).

Concernant les *Fungi*, des chercheurs rapportent la nécessité d'utiliser des concentrations plus élevées pour constater des effets d'inactivation (Růžicka *et al.*, 2003). Il a également été rapporté que certaines espèces étaient capables d'utiliser le carbone présent dans des monoglycérides pour croître dans un milieu incomplet (Doležalová *et al.*, 2010).

1.4.5 Conclusion

Les monoglycérides sont des molécules qui possèdent des propriétés spécifiques à l'égard de l'eau. Ce sont des molécules tensioactives, permettant la solubilisation de certaines phases dans l'eau. Le caractère antimicrobien de ce type de molécules est avéré en laboratoire contre

14. Par mouvement relatif des atomes les uns par rapports aux autres au sein des molécules

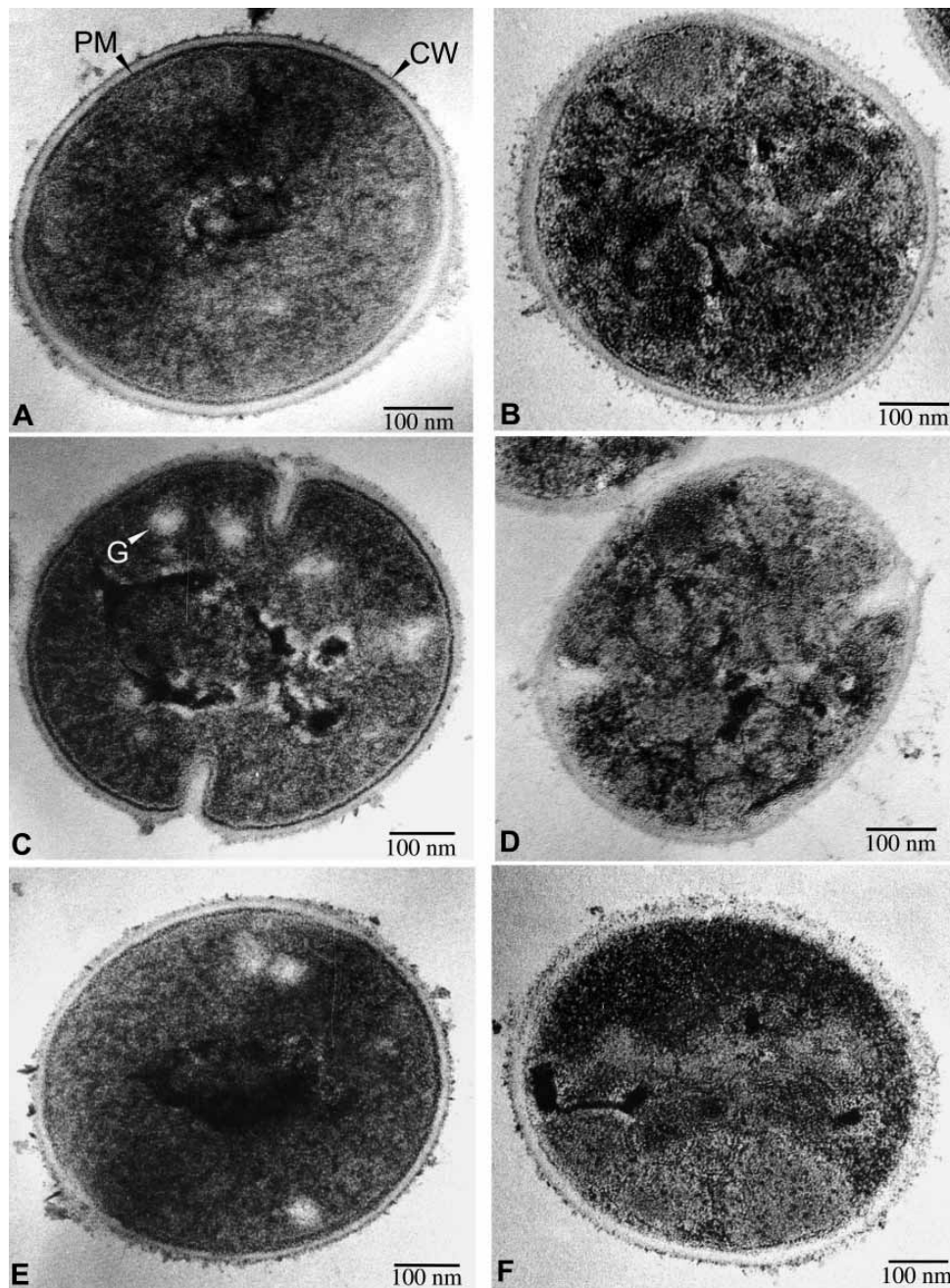


Figure 1.21 – Clichés au MET de l'effet de la monaciline sur l'ultrastructure de streptocoques. A, C et E : cellules témoins avec membrane plasmique (PM), paroi cellulaire (CW) et granules cytoplasmiques (G) intacts ; B, D et F : cellules traitées avec 10 mM de monaciline pendant 30 minutes, montrant la disparition de la membrane plasmique et des granules et quelques changements visibles sur la paroi cellulaire (Bergsson *et al.*, 2001)

divers types de micro-organismes. La littérature souligne l'influence de la longueur des chaînes carbonées et de la présence de doubles liaisons sur l'efficacité biocide. Les mécanismes d'action sont encore peu connus même si des effets au niveau de la membrane ont été observés.

1.5 Conclusion de l'étude bibliographique

La première partie de cette étude bibliographique visait à poser les bases du contexte de la dégradation de l'air intérieur par des polluants d'origine biologique. Les études de l'environnement intérieur montrent que les matériaux de construction peuvent facilement devenir des supports de prolifération microbienne et soulignent l'importance majeure de facteurs influant la croissance : l'activité de l'eau, le pH, la composition chimique et les propriétés de surface. Certaines espèces sont déjà identifiées et fréquemment retrouvées dans les environnements intérieurs humides. Toutefois, de nombreux auteurs soulignent l'hétérogénéité des résultats et le manque d'un consensus clair sur les méthodologies d'investigation.

Pour répondre à cette problématique de colonisation microbienne, la photocatalyse, procédé dépolluant simple et ne nécessitant pas de source d'énergie spécifique, est présentée comme une solution envisageable. Son principe repose sur la photo-génération d'espèces oxydantes réactives agissant sur une large gamme de polluants, en phase aérienne (COV, NO_x,...) ou en phase aqueuse (micro-organismes, ...).

Les paramètres d'essai et la mise en oeuvre du photocatalyseur sont des facteurs d'influence de l'efficacité annoncée dans la littérature. En outre, ce chapitre met également en lumière le manque d'études sur des dispositifs passifs simples et utilisables *in situ*, tels que les lasures photocatalytiques.

Ce chapitre fait également le point sur des molécules d'acides gras et d'esters, aux propriétés hygroscopiques et antimicrobiennes intéressantes. Leur efficacité de désinfection sur divers micro-organismes a été présentée. Le mode d'action des molécules, encore peu connu, semble dépendre de la longueur de la chaîne carbonée et de la présence de doubles liaisons. Des esters de glycérol, sous-produits de la fabrication du biodiesel, sont également envisagés comme une solution au problème de prolifération sur les matériaux de construction, en tant que constituants de revêtements antimicrobiens.

L'objectif de ce travail se situe à l'intersection de plusieurs thématiques de recherche et vise à utiliser les procédés décrits pour conférer aux matériaux de construction de l'environnement intérieur des propriétés antimicrobiennes.

Les informations tirées de la bibliographie soulignent le manque d'études sur les facteurs d'influence méthodologique et sur des dispositifs passifs simples, utilisant des particules de TiO₂. Généralement, les études qui traitent de l'efficacité de la photocatalyse montrent des procédés relativement complexes à mettre en oeuvre, nécessitant des compétences et du matériel spécifiques. Les lasures photocatalytiques pourraient être une solution intéressante et peu coûteuse. Elles ont notamment montré leur efficacité sur la dépollution de l'air dans différentes conditions expérimentales.

D'autres types de revêtements, à base de monoglycérides, sont également envisageables. La littérature révèle un fort potentiel antimicrobien mais, à notre connaissance, encore aucune utilisation pour protéger les matériaux de construction.

Dans un premier temps, un travail de développement et de mise en oeuvre de dispositifs expérimentaux est nécessaire afin d'adapter des méthodes d'évaluation microbiologiques sur des

matériaux particuliers (nanoparticules, revêtements, matériaux de construction). Ainsi, plusieurs essais issus de normes et de travaux antérieurs sont adaptés puis réalisés dans le but d'évaluer les performances antimicrobiennes de ces matériaux en terme (i) d'activité antibactérienne, (ii) d'effet bactéricide, (iii) de résistance à la formation de biofilm et (iv) de résistance à la prolifération par contamination naturelle.

La majeure partie de cette thèse se concentre sur le principe de la photocatalyse appliquée à la lutte contre la prolifération microbienne. Aussi, notre démarche a été d'évaluer tout d'abord les propriétés antibactériennes des nanoparticules de titane seules, avant de les inclure dans une lasure à base d'eau et d'acrylique. Ce travail préalable est nécessaire afin de mettre en évidence les divers aspects méthodologiques qui ont un impact significatif sur l'inactivation bactérienne du TiO_2 . Par la suite, les nanoparticules peuvent être incluses dans des revêtements, principalement formulés à base d'eau et d'acrylique, afin de développer des lasures photocatalytiques applicables simplement sur matériaux de construction. Ces lasures sont également caractérisées et leur performances sont évaluées aux moyens des dispositifs mis en place.

Une dernière partie explore le potentiel antimicrobien de monoglycérides, qui sont des esters de glycérol issus de sous-produits de l'agro-industrie. Les propriétés antibactériennes et bactéricides sont d'abord testées, les molécules sont évaluées en tant que revêtement pour matériaux de construction contre la prolifération microbienne.

Chapitre 2

Matériaux et Méthodes

Sommaire

2.1	Introduction	75
2.2	Matériaux	76
2.2.1	Particules de dioxyde de titane	76
2.2.2	Lasures photocatalytiques	78
2.2.3	Matériaux supports	80
2.2.3.1	Préparation des pâtes de ciment	80
2.2.4	Ester de glycérol	81
2.3	Souches Bactériennes	81
2.4	Milieux de cultures et réactifs	82
2.4.1	Milieux de culture gélosé	82
2.4.2	Milieux liquides	83
2.5	Préparation des suspensions bactériennes et dénombrement	83
2.5.1	Préparation des suspensions d'essai	83
2.5.2	Dénombrement	84
2.5.3	Calculs	85
2.6	Évaluation de l'activité antibactérienne selon les normes JIS Z 2801 et ISO 27447	86
2.6.1	Paramètres d'essai	86
2.6.1.1	Configuration de l'essai	86
2.6.1.2	Irradiation lumineuse	86
2.6.2	Validation de l'étape de neutralisation	89
2.6.3	Protocole expérimental	90
2.7	Évaluation de l'activité antibactérienne en suspension	91
2.7.1	Essai réalisé dans les conditions de la JIS Z 2801	91
2.7.1.1	Configuration de l'essai	92
2.7.1.2	Irradiation lumineuse	92
2.7.1.3	Protocole expérimental	92
2.7.2	Essais de bactéricidie selon la norme NF EN 1040	93
2.7.2.1	Préparation de la suspension d'essai	93
2.7.2.2	Déroulement de l'essai	94
2.7.2.3	Taux de réduction	96

2.8	Résistance à la formation de biofilm	96
2.8.1	Configuration	96
2.8.2	Déroulement de l'essai	96
2.8.3	Microscopie à épifluorescence	97
2.8.4	Microscopie électronique à balayage	99
2.9	Évaluation de la prolifération microbienne par contamination na-	
	turelle	99
2.9.1	Mise en œuvre de l'essai	99
2.9.2	Analyse d'images	99
2.10	Évaluation du caractère superhydrophile de surface photo-induit .	100
2.11	Conclusion	101
2.12	Annexe	102
2.12.1	Synthèse des essais mis en place et des matériaux testés	102
2.12.2	Protocole de coloration de Gram	102
2.12.2.1	Procédure	102

2.1 Introduction

Différentes méthodes d'évaluation ont été choisies et mises en œuvre dans le but d'évaluer les performances antimicrobiennes des revêtements développés pour matériaux de construction. Ces méthodes d'évaluation, couramment employées en microbiologie, n'étaient pas nécessairement adaptées à la problématique de ce travail. Aussi, de nombreux essais préliminaires ont été réalisés pour adapter les conditions expérimentales aux différents matériaux testés : les particules de TiO_2 et les revêtements de type lasure. Les principales méthodes d'évaluation mises en œuvre dans cette étude sont divisées en trois catégories, représentées sur la figure 2.1. Un récapitulatif de toutes les méthodes d'évaluation et des matériaux testés dans cette étude sont également présentés en Annexe en fin de chapitre.

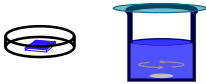
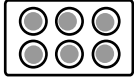

Type d'essai	Activité antibactérienne (JIS Z 2801)	Formation de biofilm	Résistance à la prolifération fongique
Evaluation	Effet bactéricide et/ou inhibiteur de croissance	Résistance à l'adhésion et au développement	Bio-réceptivité à l'échelle du matériau
Principe	Contact (0-24h)	Contact (0-24h)	Prolifération (semaines)
Configuration	Boîte de Pétri, suspension aqueuse	Plaques multipuits	Stockage en condition humide
Souches bactériennes	<i>E. coli</i> , <i>B. Pumilus</i>	<i>E. coli</i>	Contamination naturelle
Méthode d'évaluation	UFC	UFC, MEB Epifluorescence	Analyse d'images
			

Figure 2.1 – Vue d'ensemble des méthodes d'évaluation de la résistance aux micro-organismes utilisées dans ces travaux.

Une partie traite de l'activité antibactérienne des matériaux au moyen d'essais en boîtes de Petri ou en suspension. Elle permet d'évaluer les effets bactéricides ou inhibiteurs de croissance. Le deuxième type d'essai concerne la résistance à la prolifération de biofilm. Ces essais sont réalisés en microplaques multipuits, en solution aqueuse, et permettent d'évaluer la résistance d'un matériau à l'adhésion et au développement des micro-organismes. La dernière catégorie concerne les essais de résistance à la prolifération par contamination naturelle. Les essais sont réalisés en chambre humide et donnent une idée de la bio-réceptivité à l'échelle du matériau.

Chacune des méthodologies d'évaluation fournit des informations sur la qualité des propriétés antibactériennes d'un matériau. Les techniques d'analyse sont principalement basées sur la culture et l'observation.

La première partie de ce chapitre présente les différents matériaux mis en œuvre et testés au cours de cette thèse.

Les parties 3, 4 et 5 décrivent les conditions de mise en œuvre des manipulations, les méthodes de conservation et de préparation des souches bactériennes ainsi que les principaux milieux et réactifs utilisés au cours des différents essais.

Les parties suivantes détaillent la mise en place des méthodes d’essais visant à évaluer les propriétés antimicrobiennes des matériaux.

La dernière partie présente les méthodes de caractérisation et d’observation réalisées sur les matériaux.

2.2 Matériaux

2.2.1 Particules de dioxyde de titane

Des particules de TiO_2 sous forme pulvérulente et sous forme de dispersion aqueuse ont été utilisées au cours de cette thèse.

Dans un premier temps, l’objectif était de mettre à jour les paramètres d’influence du processus photocatalytique obtenu avec du TiO_2 seul, c’est-à-dire non lié à un dispersant chimique et non inclus en lasure. Trois poudres de TiO_2 commerciales couramment utilisées dans la littérature ont été testées dans le noir¹ : Millenium PC500, KRONOClean 7000 (VLP7000), KRONOClean 7050 (VLP7050).

Les caractéristiques des poudres d’oxyde de titane sont présentées dans le tableau 2.1. La forme minéralogique principale de ces poudres est l’anatase. Une analyse par diffraction de rayons X (DRX) a été réalisée sur les trois produits. Les résultats sont présentés sur la figure 2.2.

	Millenium PC500	VLP7000	VLP7050
Teneur en TiO_2 (anatase)	85%	87,5%	85%
Taille des particules (nm)	10-15*	≈ 15	≈ 15
Surface spécifique (BET) (m^2/g)	375	≤ 225	≤ 225

Tableau 2.1 – Caractéristiques des poudres de TiO_2 commerciaux utilisés dans ces travaux, issus des fiches fournisseurs. Données issues des travaux de Nu Hoai Nguyen *et al.* (2005)

Les particules sont de taille nanométrique selon les fiches techniques des fournisseurs (Tableau 2.1) mais les oxydes de titane commercialisés, sous forme de poudre ou de dispersion aqueuse, présentent un état d’agglomération des particules, lié aux charges de surface, qui fait que les poudres se trouvent sous forme d’amas de plusieurs centaines de nanomètres, parfois de l’ordre du micromètre (Figure 2.3). L’étude de Nu Hoai Nguyen *et al.* (2005) met par ailleurs en évidence des agglomérats de dimension comprise entre 600 et 700 nm pour la poudre de Millenium PC 500.

Selon la littérature, l’optimisation des rendements photocatalytiques peut être obtenue par des tailles de particules nanométriques, qui nécessite généralement un conditionnement des

1. Dans ce cas, il ne s’agit pas d’évaluer l’activité antibactérienne de la photocatalyse mais des particules elles-mêmes

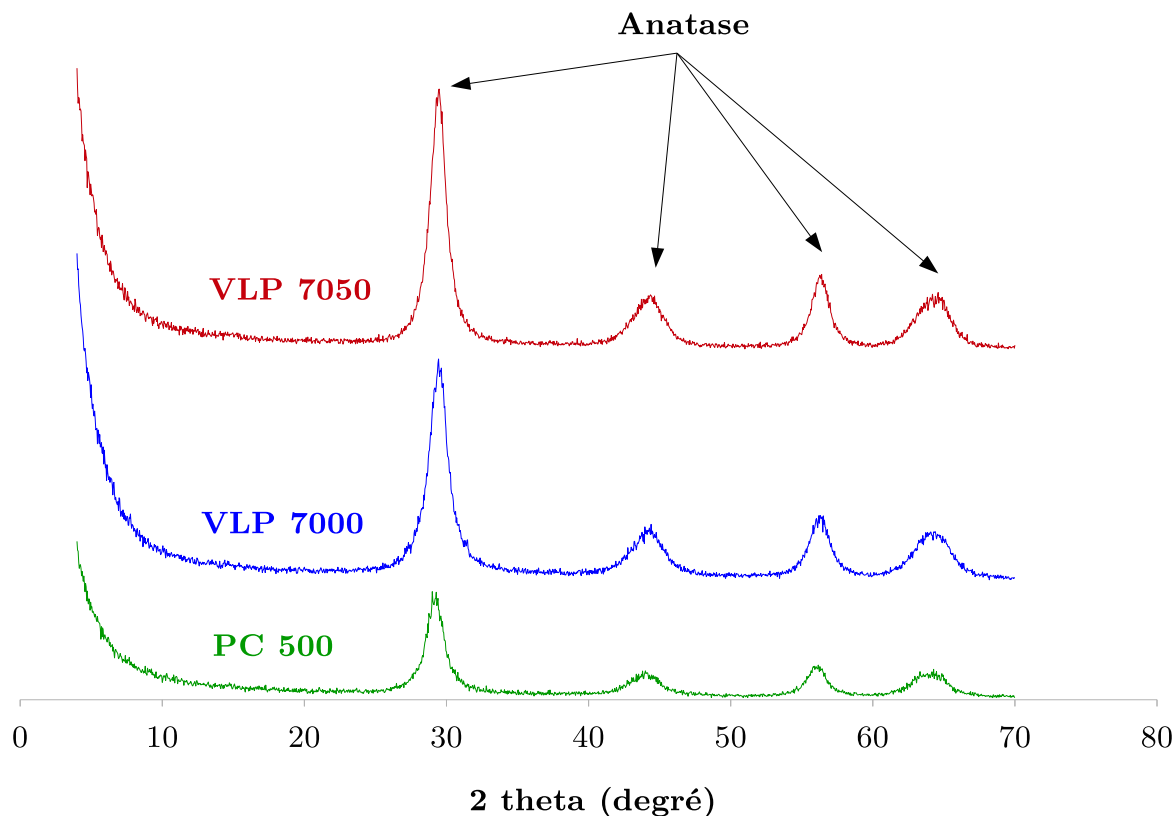


Figure 2.2 – Analyse DRX (cathode Co) des dioxydes de titane commerciaux.

poudres. Ces processus de transformation requièrent du matériel et des compétences spécialisées. Ne disposant pas des moyens nécessaires à ce conditionnement, et afin de ne pas introduire un paramètre supplémentaire (produit chimique de dispersion) qui aurait pu avoir un impact intrinsèque sur les micro-organismes, nous avons choisi de travailler avec les poudres non transformées, constituées d'agréats de l'ordre du micromètre. Dans la suite de cette étude, il est donc fait mention de particules de TiO_2 et non de nanoparticules.

Dans le cadre de l'environnement intérieur, le travail de méthodologie sur les paramètres d'influence de la photocatalyse est indispensable pour développer des revêtements photocatalytiques pour les matériaux de construction. Une bonne efficacité photocatalytique des poudres de TiO_2 était ainsi requise pour la mise en place de cette méthodologie. Pour mémoire, les résultats d'abattement des gaz (NO et NO_x) de deux TiO_2 , conventionnel et dopé, présentés au chapitre 1, partie 1.3.1.3.2, ont montré des efficacités similaires mais relativement faibles pour les deux dioxydes de titane irradiés par un néon classique. Lors d'une irradiation par une lumière UV, le dioxyde de titane conventionnel (non dopé) a montré de meilleures performances que le dioxyde de titane dopé. Par ailleurs, ne disposant pas du recul nécessaire pour s'assurer d'une telle efficacité avec le dioxyde de titane dopé de chez Kronos (VLP7000), nous avons préféré l'écarter de la suite de notre étude. Notre choix s'est donc porté sur des particules de TiO_2 conventionnel, activable par un rayonnement de lumière UV. Ce type de matériau devra néanmoins être étudié dans des travaux ultérieurs.

En outre, des essais préliminaires à ce travail nous ont montré de bons résultats d'abattement de NO_x et NO avec une dispersion utilisant le VLP7050 comme TiO_2 . C'est donc cette poudre

de TiO_2 qui a été utilisée pour évaluer l'influence des facteurs méthodologiques sur l'efficacité de l'activité antibactérienne photocatalytique. La figure 2.3 présente des clichés au microscope électronique à balayage réalisés sur le VLP7050 dilué dans de l'eau.

Dans un deuxième temps, il s'est agit d'évaluer les propriétés de lasures photocatalytiques incluant des particules de TiO_2 . Afin d'obtenir la meilleure efficacité possible des revêtements appliqués sur matériaux de construction, une répartition des particules la plus homogène possible est essentielle. Les poudres de TiO_2 doivent être stabilisées en dispersion en phase aqueuse afin de réduire l'état d'agglomération des particules (Figure 2.3). Dans un premier temps, des lasures ont été préparées avec le titane VLP7050 sous agitation mécanique. Les résultats d'efficacités sont présentés au chapitre 4. Ne disposant pas du matériel adapté à cette opération de stabilisation, nous nous sommes finalement tournés vers une dispersion chimique commerciale : le produit d'essai Kronos Type 7454.

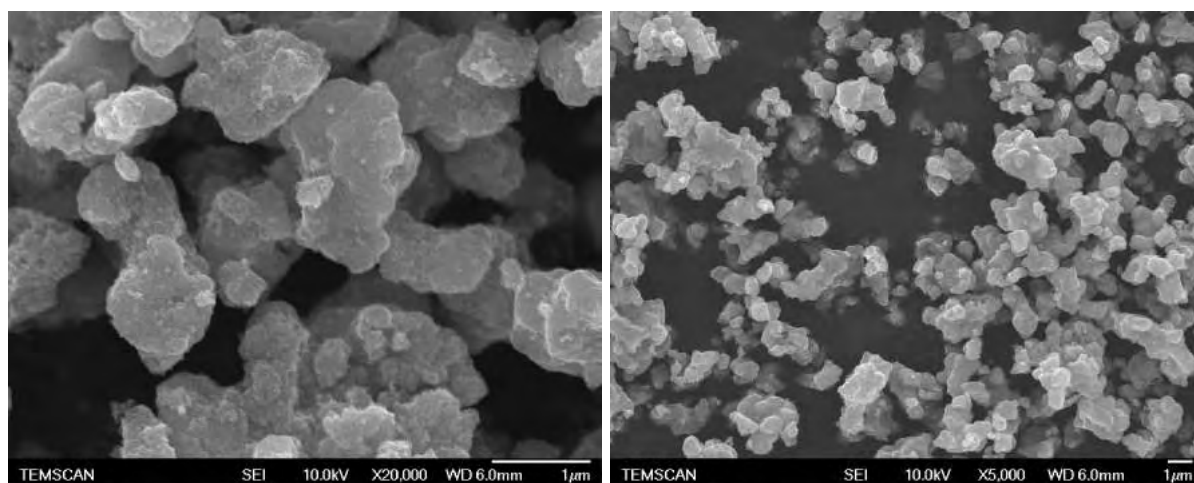


Figure 2.3 – Clichés MEB d'une poudre de TiO_2 de chez Kronos diluée dans de l'eau, non dispersée chimiquement

2.2.2 Lasures photocatalytiques

Une première lasure à base de particules de TiO_2 a été développée à partir des travaux de Martinez *et al.* (2011) et Martinez (2012), traitant de la dépollution de l'air (NO_x , COV, ...) et répondant au cahier des charges suivant :

- efficacité photocatalytique pour l'abattement de la pollution gazeuse (de 30% à 50% d'abattement des NO_x et NO (Martinez, 2012))
- durabilité de l'accroche du revêtement (propriétés mécaniques d'adhésion) (Martinez, 2012)
- transparence du revêtement ou homogénéité de la coloration sur matériau
- innocuité : émission de COV faible ou nulle (Martinez *et al.*, 2011)

L'utilisation de TiO_2 en poudre plutôt que sous forme de dispersions a imposé d'adapter la formulation. En effet, le taux de TiO_2 en masse sèche dans la dispersion chimique n'était pas égal à 100%. Le Tableau 2.2 présente les 4 constituants principaux utilisés pour formuler la lasure : de l'eau, des particules de TiO_2 photocatalytiques et un mélange silicate/acrylique

comme liant. La teneur en liant doit permettre une tenue suffisante de la lasure sans entrainer de phénomène d'encapsulation des particules au sein de la matrice. Il est important de rappeler que la réaction photocatalytique est un phénomène qui dégrade les matières organiques, incluant les liants organiques. Aussi, un équilibre est nécessaire dans les dosages entre les liants organique et inorganique pour permettre d'offrir une résistance vis-à-vis du phénomène photocatalytique tout en maintenant la dureté et l'accroche du revêtement.

Constituants	Quantité (%)	Fonction
Eau	75	Solvant
TiO ₂	5	Photocatalyseur (poudre)
Silicates	12,5	Liant inorganique : résistance à la photocatalyse
Acrylique	7,5	Liants organiques : tenue, accroche

Tableau 2.2 – Constitution de la première lasure LP_{psi}

Les mesures d'activité antimicrobienne de cette lasure sont exposés dans le chapitre 4. Une vérification au papier pH nous a permis d'observer un gradient de pH dans une goutte déposée sur la lasure (Figure 2.4). Le pH au sein de la goutte était autour de 7 tandis qu'au contact du revêtement, la solution avait un pH autour de 12, démontrant le caractère alcalin de celui-ci.

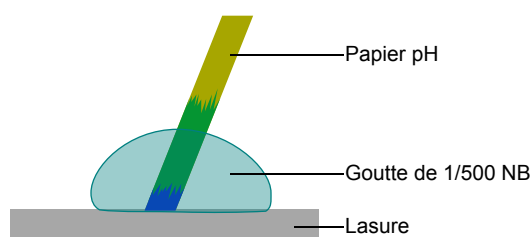


Figure 2.4 – Schéma d'estimation du pH d'une goutte d'inoculum au contact de la lasure LP_{psi}

Afin de découpler les effets antibactériens liés à la photocatalyse et au pH basique, deux autres lasures ont été formulées, sans silicates, en augmentant légèrement la quantité d'acrylique. Les résultats d'expérience sont également présentés dans le chapitre 4. La dernière lasure est celle qui est étudiée dans la suite du chapitre. Elle a été formulée avec la dispersion chimique commerciale de chez Kronos, Type 7454. Les constituants de la lasure, notée LP_{dis}, sont présentés dans le tableau 2.3.

Constituants	Quantité (%)
Eau	93
TiO ₂ , dispersion	5
Acrylique	2

Tableau 2.3 – Constitution de la lasure LP_{dis}, choisie pour la suite de cette étude.

Le tableau 2.4 présente un récapitulatif de toutes les lasures photocatalytiques (LP) formulées et testées au cours de ces travaux.

Réf.	TiO ₂	Silicates
LP _{psi}	Poudre VLP7050	Oui
LP _{p1}	Poudre VLP7050	Non
LP _{p2}	Poudre VLP7050	Non
LP _{dis}	Dispersion chimique 7454	Non

Tableau 2.4 – Liste synthétique des lasures photocatalytiques utilisées au cours de ces travaux de thèse.

2.2.3 Matériaux supports

Différents matériaux ont été utilisés comme support des lasures photocatalytiques pour évaluer leurs propriétés antibactériennes :

- des lamelles de verre (26×76 mm) couramment employées en microscopie optique
- des membranes Isopore en polycarbonate (Millipore), avec les caractéristiques physiques suivantes : diamètre membrane = 47 mm ; diamètre pores de 0,4 μm ; porosité = 5%–20% ;
- des tranches de cylindres de pâtes de ciment

2.2.3.1 Préparation des pâtes de ciment

Il a été vu dans le chapitre 1 que le pH est un facteur déterminant de la croissance microbienne, notamment sur les matériaux de construction. Dans leur travaux sur le développement d’essais accélérés en laboratoire pour étudier la prolifération fongique, Wiktor *et al.* (2009, 2010) ont montré que, pour des matériaux cimentaires, la diminution du pH de surface était nécessaire à l’augmentation de la bio-réceptivité des matériaux. Les matériaux cimentaires aux jeunes âges ne sont pas, ou très peu, sensibles à la colonisation microbienne, du fait des pH alcalins autour de 12-13. De manière générale, la bio-réceptivité de ces matériaux augmente dans le temps, à mesure que les phénomènes de carbonatation se déclenchent et réduisent le pH de surface. Mais ces processus se déroulent très lentement. C’est pourquoi, dans le cadre de nos essais en laboratoire, la réalisation d’un vieillissement accéléré des matrices cimentaires est essentielle.

Du ciment Portland ordinaire, CEM I 52,5R, a été utilisé pour couler les pâtes de ciment dans des petits moules cylindriques ($d = 2,8$ cm ; $h \approx 1$ cm) avec un ratio E/C égal à 0,5. Les échantillons ont été démoulés après 24h en condition endogène et stockés en chambre humide (100%HR, température ambiante) pendant 27 jours. Puis, les échantillons ont subi une étape de lixiviation, décrite ci-dessous, avant d’être à nouveau placés en chambre humide jusqu’à l’application du revêtement photocatalytique pour le test.

Après l’étape de lixiviation et une semaine avant chaque essai, les cylindres ont été enduits de 0,5 ml de lasure LP_{psi} ou de lasure témoin sans particule de TiO₂, à l’aide d’une pipette, de façon à recouvrir la totalité de la surface puis disposés sous hotte à flux laminaire pour séchage pendant approximativement 8h. Après ce temps, une couche homogène s’est formée sur l’ensemble des échantillons. Toutefois, sur certains cylindres la couche était craquelée. Lorsque cela s’est produit, l’adhésion de la lasure au support a été jugée compromise et les échantillons ont été nettoyés puis recouverts à nouveau de 0,5 ml de lasure, de façon à obtenir une couche

homogène. Après le séchage, les échantillons ont été placés sous irradiation UV pendant environ 80h à 3 W/m^2 .

2.2.3.1.1 Protocole de lixiviation des pâtes de ciment : Le schéma de montage du protocole de lixiviation est présenté sur la figure 2.5. Le dispositif était composé d'un réacteur en verre (borosilicate) de volume utile 2 litres. Le réacteur était alimenté continuellement par une solution lixiviante grâce à une pompe digitale Cole Parmer (Masterflex L/S). Le débit avait été réglé à 1,4 ml/min, de façon à renouveler la solution du réacteur en 24 heures. La solution lixiviante était une solution aqueuse d'acide acétique (CH_3COOH), dosée à 0,12 mol/l et dont le pH avait été ajusté, à l'aide de soude (NaOH) 0,076 mol/l, à 4,7. Le pH de la solution en sortie de réacteur était contrôlé quotidiennement. Le dispositif était maintenu actif, en approvisionnant le réservoir régulièrement avec le mélange acide acétique / soude, jusqu'à obtention d'un pH de surface des échantillons autour de 7.

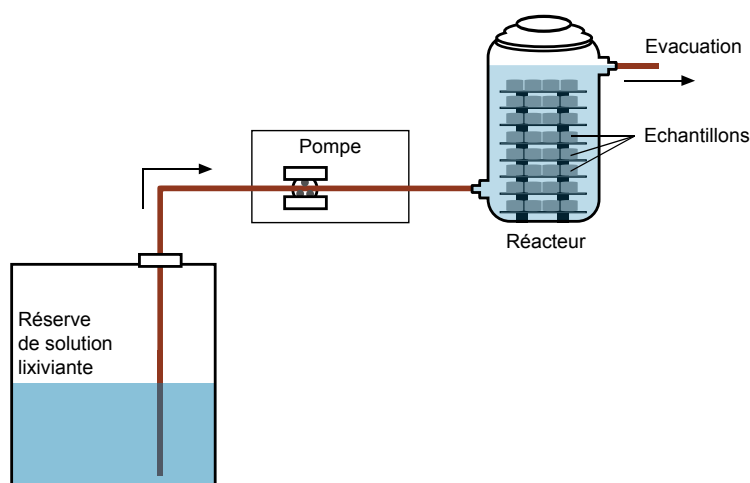


Figure 2.5 – Schéma de montage de l'étape de lixiviation des pâtes de ciment.

2.2.4 Ester de glycérol

Des monoglycérides (MG) sont utilisés dans le cadre de cette thèse. Il s'agit de produits dont la formule est confidentielle, qui ont été développés dans un projet antérieur avec le LMDC.

Différents essais ont été menés afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de ces monoglycérides. Ces essais ont également un objectif de valorisation de sous-produits issus de l'agro-industrie, dans le cadre de l'élaboration de solutions à destination de l'industrie du BTP. Il s'agit de produits issus de l'esterification du glycérol avec différents acides, permettant la formation de sous-produits, tels que le mono-octanoate de glycérol ou le mono-décanoate de glycérol, avec des propriétés tensioactives.

2.3 Souches Bactériennes

Deux souches bactériennes ont été utilisées dans ces travaux :

- *Escherichia coli* CIP 53126
- *Bacillus Pumilus* CIP 53126

Les souches de collection de l'Institut Pasteur ont été utilisées en suspension. Elles sont conservées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en bouillon Eugon avec 10% de glycérol. Avant chaque essai, les cellules bactériennes sont pré-cultivées en tube sur TSA (Tryptocaséine Soja Agar) en pente. Elles sont ensuite transférées sur boîte de Petri et incubées à $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 à 48h. Puis, les cellules bactériennes sont transférées à l'aide d'une anse en plastique (oëse) sur une nouvelle gélose TSA et incubée à $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 16h à 24h. Lors de chaque expérience, on utilise le dernier repiquage pour réaliser la suspension bactérienne d'essai.

Préparation de spores de *Bacillus Pumilus*

La suspension de spores de *Bacillus Pumilus* CIP 52.62 a été réalisée selon les préconisations de la norme NF T 72-281 (2009). Un bouillon de culture (TGB) et une gélose (MYA) spécifiques ont été préparés (Tableau 2.5 et 2.6, p. 83). Après stérilisation à l'autoclave (121°C , 15 min), la gélose MYA en surfusion est répartie dans des fioles de Roux stériles.

Une oëse de cellules végétatives de *B. Pumilus* sur TSA est dispersée dans 10 ml de bouillon TGB. La concentration est ajustée à environ 10^8 UFC/ml au spectrophotomètre, puis diluée pour obtenir 10^8 UFC/ml. Le tube est ensuite incubé à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24h.

Après incubation, environ 5 ml de suspension sont transférés dans une fiole de Roux contenant la gélose MYA. La fiole est inclinée dans plusieurs directions de manière à ce que l'inoculum recouvre la totalité de la surface. L'inoculum en excès est pipetté et rejeté. Les fioles de Roux ainsi inoculées sont incubées à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en prenant garde à laisser les bouchons légèrement dévissés.

A partir de 5 jours d'incubation, l'état de sporulation est contrôlé régulièrement. Des colorations de Gram² sont réalisées à partir de prélèvements à l'oëse dans la boîte de Roux. Cette étape donne une indication sur la quantité de bactéries végétatives encore présentes.

Après 20 jours d'incubation, les cultures sont récupérées à l'aide de 15 ml d'eau distillée stérile et placées dans un tube Falcon. Les échantillons sont centrifugés à 3600 tours/min pendant 20 minutes puis le surnageant est éliminé. De l'eau distillée stérile (EDS) est ajoutée en quantité suffisante pour un volume de 15 ml et l'étape précédente est répétée 3 fois (4 lavages au total). La suspension est transférée dans un flacon Shott avec bouchon qui est placé au bain marie à $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 minutes pour élimination des formes végétatives résiduelles. Les spores sont ensuite titrées par une série de dilutions au 10° ensemencées sur gélose TS. Elles sont finalement conservées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

2.4 Milieux de cultures et réactifs

2.4.1 Milieux de culture gélosé

Un milieu gélosé trypticase-soja (Tableau 2.5) a été utilisé comme milieu de culture solide pour le dénombrement des UFC microbiennes. Les ensemencements des boîtes de Petri ont été réalisés par inclusion de 1 ml de suspension bactérienne dans 10 à 15 ml de gélose en surfusion ($\approx 45\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2. Protocole détaillé en fin de chapitre, page 102

Un milieu spécifique a été réalisé pour l'étape de préparation des spores de *B. pumilus*. La composition du milieu est également présentée dans le tableau 2.5.

Milieux	Composants	Concentration (g/L)
TSA	Tryptone	15,0
	Peptone de soja	5,0
	Chlorure de sodium	5,0
	Agar	15,0
Gélose MYA	Extrait de viande	10,0
	Extrait de levure	2,0
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,04
	Agar	15,0

Tableau 2.5 – Composants des milieux de culture utilisés pour le dénombrement des UFC (TSA) et la préparation de spores de *B. Pumilus* (MYA). Conservation : 1 mois max à 4°C.

2.4.2 Milieux liquides

Différents milieux liquides ont été utilisés au cours de ces travaux. Le premier est le milieu *Nutrient Broth*, préparé d'après la norme JIS Z 2801 (2010). Un autre milieu a été préparé pour préparer les spores de *B. pumilus*. Les compositions sont présentées dans le tableau 2.6.

L'étape de récupération des bactéries à partir du matériau testé a nécessité l'usage d'un agent tensioactif non-ionique. Une solution de récupération a été préparée d'après la norme JIS Z 2801 (2010) à partir des composants suivants : caséine peptone, peptone de soja, chlorure de sodium, phosphate de sodium dibasique, glucose, lécithine et Tween 80 (Tableau 2.6).

Un milieu spécifique est utilisé pour évaluer la formation de biofilm. La préparation de ce bouillon est issue de nombreux travaux sur la formation de biofilms de différentes espèces bactériennes : (Alasri *et al.*, 1992; Campanac *et al.*, 2002; Khalilzadeh *et al.*, 2010; Pineau *et al.*, 1997; Samrakandi *et al.*, 1997).

Le tableau 2.7 présente les différents composants du Bouillon Biofilm Modifié (BBM). Afin d'éviter la précipitation d'un des composants (MgSO₄), celui-ci doit être autoclavé séparément.

2.5 Préparation des suspensions bactériennes et dénombrement

2.5.1 Préparation des suspensions d'essai

Pour l'ensemble des manipulations, la suspension bactérienne d'essai (inoculum) est réalisé de la même manière. Seule la concentration finale peut changer en fonction du type d'essai.

Une oëse de la dernière culture bactérienne, préparée en 2.3, est dispersée, selon le type de test, soit dans 9 ml du bouillon NB dilué au 500^e (JIS Z 2801, 2010), soit dans 9 ml d'eau

Milieux	Composants	Concentration (g/L)
Bouillon TGB	Extrait de levure	2,5
	Tryptone	5,0
	Glucose	1,0
NB	Extrait de viande	3,0
	Peptone	10,0
	NaCl	5,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
SCDLP	Tryptone	17,0
	Peptone de soja	3,0
	NaCl	5,0
	Na ₂ HPO ₄	2,5,0
	Glucose	2,5
	Lécithine	1,0
	Tween 80	7,0

Tableau 2.6 – Composants des milieux liquides utilisés. Valeurs de masse sèche pour 1 l d'eau distillée stérile. Conservation : 1 mois max à 4°C.

distillée stérile. La concentration de la suspension bactérienne est ajustée à environ 10^8 UFC/ml à l'aide d'un spectrophotomètre (640 nm). Afin de vérifier la concentration, une série de dilution au dixième est réalisée et 2×1 ml de la dilution 10^{-6} sontensemencés par inclusion en gélose TS. La suspension d'essai (inoculum) est également préparée par série de dilutions à partir de la suspension bactérienne initiale à une concentration finale entre $2,5 \times 10^5$ et 10×10^5 UFC/ml.

2.5.2 Dénombrement

Après chaque expérience, une étape de neutralisation de l'effet antibactérien est réalisée par filtration ou par ajout de milieu SCDLP. Les suspensions bactériennes (sur témoins et matériaux tests) sont récupérées et diluées en séries au 10^e . Pour chaque dilution, 2×1 ml sontensemencés

Composants	Concentration (g/L)
FeSO ₄ ,7 H ₂ O	0,0005
Na ₂ HPO ₄	1,25
KH ₂ PO ₄	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
Glucose	0,05
MgSO ₄ ,7 H ₂ O*	0,2

Tableau 2.7 – Composition du Bouillon Biofilm Modifié. * À autoclaver séparément.

en gélose TS dans deux boîtes de Petri distinctes et incubés à 36°C pendant 48h.

Après incubation, les UFC sont dénombrées sur gélose. Les limites d'acceptation de comptage sont situées entre 30 et 330 UFC sur une boîte de Petri entière et entre 14 et 165 sur membrane de filtration.

Lorsque le nombre d'UFC sur la plus faible dilution est <1 , 1 est pris comme nombre d'UFC par défaut et le signe $<$ est noté devant la moyenne ; lorsque le nombre d'UFC est supérieur à 330 sur la dilution la plus élevée, 330 est pris pour le calcul et le signe $>$ est noté devant la moyenne.

2.5.3 Calculs

A partir de la lecture du nombre d'UFC sur 2 boîtes de Petri par dilution, on peut remonter au nombre total de bactéries contenues dans l'échantillon :

$$N_i = \frac{N_1 + N_2}{2 \times F} \quad (2.1)$$

Où N_1 et N_2 sont les nombres d'UFC directement lus et F est le facteur de dilution. N_i correspond ainsi au nombre d'UFC sur une dilution.

Le calcul des UFC est effectué pour chaque échantillon, qui compte trois réplicats par configuration. La moyenne des trois valeurs est utilisée pour le calcul de l'activité antibactérienne.

L'activité antibactérienne est alors calculée comme la différence entre la moyenne des UFC relevées sur les 3 témoins et la moyenne des UFC sur les 3 échantillons de matériau à tester, en logarithme de base 10. Ainsi :

$$A = \log(N_{tem}) - \log(N_{mat}) = \log\left(\frac{N_{tem}}{N_{mat}}\right) \quad (2.2)$$

Où A correspond à l'activité antibactérienne ; N_{mat} et N_{tem} sont les nombres d'UFC (moyenne des triplicats) sur le matériau testé et sur le témoin, respectivement. Pour chaque essai, un test t de Student a été réalisé afin de s'assurer que la différence entre N_{mat} et N_{tem} soit significative. Ainsi, les activités antibactériennes présentées dans cette thèse sont suivies de la mention "p=0,001", où p correspond à la probabilité d'une activité nulle ($N_{mat} = N_{tem}$). De manière générale, un résultat est considéré comme significatif lorsque $p \leq 0,05$ (qui correspond à un intervalle de confiance de 95%). Les résultats sont donnés avec les erreurs standards (**es**) correspondantes, de la manière suivante : moyenne \pm es.

Les études traitant de la désinfection photocatalytique rapportent également leurs résultats en terme d'activité relative par rapport au témoin :

$$Ar = \left(\frac{\log(N_{tem}) - \log(N_{mat})}{\log(N_{tem})} \right) \times 100 \quad (2.3)$$

2.6 Évaluation de l'activité antibactérienne selon les normes JIS Z 2801 et ISO 27447

La norme JIS Z 2801 (2010) décrit une méthode standardisée d'évaluation de l'activité antibactérienne d'une surface. L'essai porte sur *E. coli* et *S. aureus* CIP avec une évaluation de l'activité antibactérienne après 24h de contact d'une suspension dosée à 10^5 UFC/ml sur une surface de 4 cm × 4 cm à $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ et à plus de 90% HR.

L'action antimicrobienne est évaluée par dénombrement des UFC (Unité Formant Colonie) récupérées à partir de la surface d'essai vs la surface témoin (sans activité antibactérienne) ou vs une surface de contrôle (comme le fond d'une boîte de Petri par exemple).

La norme ISO 27447 (2009) est semblable à la norme JIS mais pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de céramiques photocatalytiques.

Dans le cadre des essais réalisés au cours de cette thèse, et en considérant nos objectifs, certaines conditions d'essai ont été adaptées :

- une température de 25°C , considérée comme une température ambiante,
- des temps de contact plus courts,
- un micro-organisme différent : spores de *B. pumilus*

2.6.1 Paramètres d'essai

2.6.1.1 Configuration de l'essai

Afin d'éviter un séchage de l'inoculum et d'entraîner l'inactivation des cellules bactériennes, des boîtes de Petri en borosilicate³ ont été spécialement fabriquées avec un anneau externe capable de recevoir une solution saturée de nitrate de potassium (KNO_3) (Figure 2.6); une humidité relative autour de 90% a ainsi pu être maintenue à l'intérieur des boîtes pour chaque échantillon. Les essais ont été réalisés dans une pièce climatisée à 25°C . Le suivi des conditions hygrométriques a été effectué sur deux essais à l'aide de hygropuces (Waranet) placées dans les boîtes conçues (Figure 2.6).

Pour chaque essai, deux configurations sont lancées en parallèle : Avec / Sans irradiation lumineuse. Des boîtes en borosilicates contenant des échantillons avec du TiO_2 et des boîtes témoins sans TiO_2 sont placées dans les deux configurations comme l'indique le schéma de la figure 2.7.

2.6.1.2 Irradiation lumineuse

Les valeurs d'irradiance annoncées généralement dans la littérature sont très variées : autour de 10 W/m^2 (Maness *et al.*, 1999; Sunada *et al.*, 1998, 2003) jusqu'à 500 W/m^2 (pour des longueurs d'ondes de photons habituellement comprises entre 300 et 400 nm). Ces valeurs s'éloignent des conditions d'éclairement intérieur, où la part d'UV est généralement plus faible. A titre comparatif, des valeurs d'éclairement énergétique autour de 30 W/m^2 ont été mesurées en extérieur, par une journée ensoleillée (Blöß et Elfenthal, 2007; Fujishima et Zhang, 2006;

3. Le borosilicate a notamment été choisi pour sa capacité à laisser passer les UV et sa résistance à l'autoclavage à 121°C .

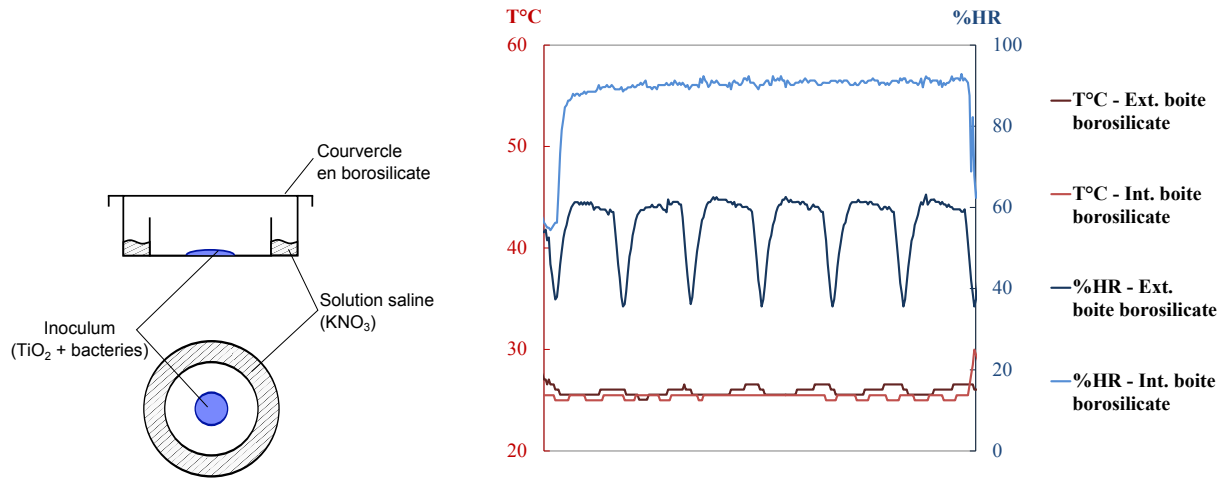


Figure 2.6 – Gauche : Schéma de la boîte en borosilicate. Droite : Diagramme de suivi des conditions hygrométriques pendant un essai, à l'intérieur et à l'extérieur d'une boîte de Petri en borosilicate.

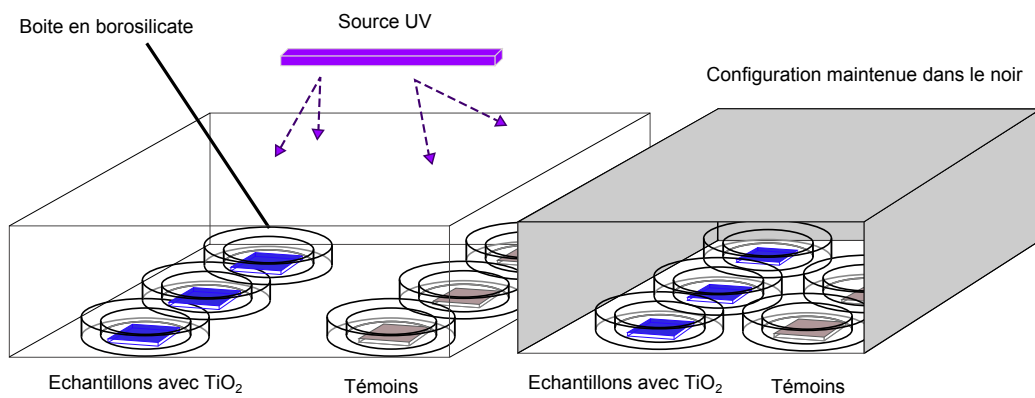


Figure 2.7 – Schéma des configurations de l'essai d'inactivation en boîte de Petri.

Martinez *et al.*, 2011), et entre 5 et 10 W/m² lors de journées nuageuses (Hüsken *et al.*, 2009; Martinez, 2012).

Quelques études ont indiqué l'inactivation de micro-organismes à des valeurs d'irradiance autour de 0,01 W/m² (Ishiguro *et al.*, 2011), avec des taux d'inactivation bien inférieurs, confirmant l'impact majeur de l'irradiance sur l'efficacité du processus.

En outre, les ultraviolets de longueurs d'ondes autour de 325-400 nm peuvent créer des dommages importants aux micro-organismes et entraîner leur mort. Parmi les mécanismes décrits, ils sont notamment susceptibles d'engendrer des cassures au niveau des brins d'ADN (Prescott *et al.*, 2010). La norme ISO 27447 (2009) recommande l'utilisation de faibles irradiances pour les essais photocatalytiques et présente des cinétiques d'inactivation de bactéries sur des cellules irradiées aux UV.

Les figures 2.8 et 2.9 montrent l'inactivation bactérienne sur des cellules de *E. coli* soumises à une irradiation UV. La figure 2.8 présente le graphique disponible dans la norme ISO 27447 (2009) ; la figure 2.9 montre les résultats d'essai selon différentes configurations : avec/sans couvercle en borosilicate et dans le noir. Le témoin dans le noir montre une croissance de près de 2 log en 24h d'essai tandis qu'aucune bactérie n'a été détectée sur les échantillons irradiés aux UV à environ 2,5 W/m². La configuration avec un couvercle en borosilicate, qui permet de maintenir l'hygrométrie dans la boîte tout en laissant passer les radiations UV, ne perturbe que très légèrement la croissance bactérienne en 24 h. Pour les trois configurations, aucune perturbation n'est visible dans les 6 premières heures de test.

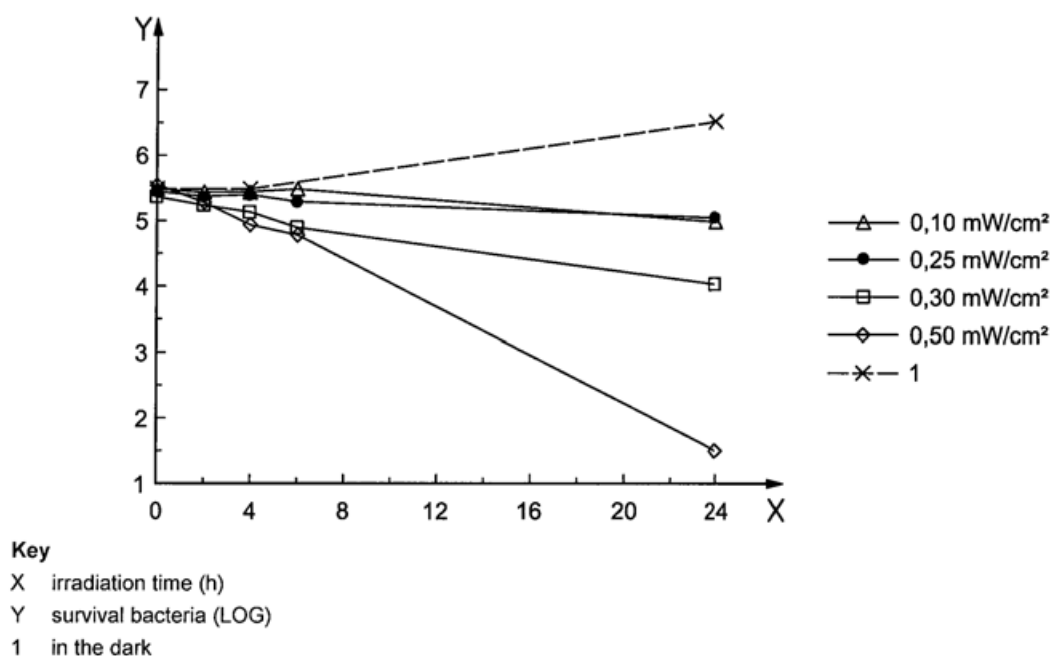


Figure 2.8 – Effet d'une irradiation UV sur la survie de cellules bactériennes *E. coli*, (ISO 27447, 2009).

Ainsi, lors de l'élaboration du dispositif expérimental, le type, l'emplacement et la puissance du luminaire devait permettre de satisfaire à un ensemble de paramètres liés à l'activation du photocatalyseur en prenant soin d'éviter toute action létale du rayonnement UV sur les bactéries.

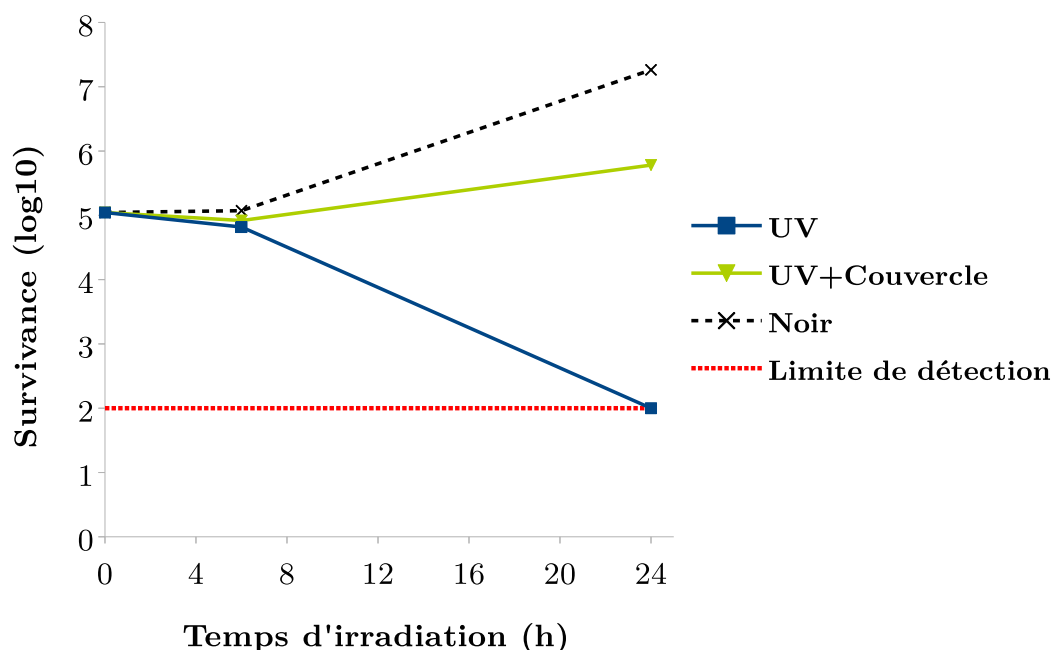


Figure 2.9 – Effet d’une irradiation UV sur la survie de cellules bactériennes *E.coli* lors d’un essai en boîte de Petri, irradiance $\approx 2,5 \text{ W/m}^2$.

Des tubes néons de lumière noire 8 W ont été choisis. La distance entre les lampes et les échantillons a été ajustée de manière à obtenir une irradiance appropriée pour l’essai sans augmentation trop importante de la température. Les essais ont été menés entre 2 et 4 W/m^2 . L’irradiance est mesurée au niveau des échantillons à l’aide d’un optomètre (Gigahertz-Optik X11) équipé d’une sonde radiométrique dans la gamme de longueur d’onde 310-400 nm.

2.6.2 Validation de l’étape de neutralisation

Dans cette étude, le principe des expérimentations repose l’évaluation de l’activité antibactérienne après un temps de contact défini entre des cellules bactériennes et le matériau photocatalytique. Afin d’étudier l’inactivation bactérienne des supports pendant un temps donné, il a été nécessaire, dans un premier temps, de valider les étapes de neutralisation de l’agent ou des agents antimicrobiens et de récupération des micro-organismes. Ces étapes visaient à éviter des biais dans les mesures dans le cas où : (a) la récupération emporte également une partie du matériau antimicrobien toujours actif et le processus d’inactivation se poursuit jusqu’à la lecture des résultats 48 heures plus tard, le nombre d’UFC est alors sous estimé, ou (b) la récupération n’est pas complète et une partie des organismes ne peut pas être récupérée à partir des échantillons.

Pour l’expérience de mise en contact de cellules bactériennes avec des particules de TiO_2 non immobilisées sur support, une étape de filtration sur membrane a été choisie comme méthode de neutralisation/séparation. La membrane est choisie avec un diamètre de pore suffisamment petit pour retenir les bactéries et assez large pour laisser passer les particules de TiO_2 . L’objectif n’était pas de viser la séparation intégrale des bactéries et des particules mais plus simplement de s’assurer que la séparation était suffisante pour stopper d’éventuels effets antibactériens post-expérimentaux. Le principe de la validation consistait donc à comparer le nombre d’UFC sur

une membrane utilisée pour filtrer une suspension bactérienne contenant des particules de TiO_2 et une membrane ayant filtré une suspension bactérienne témoin.

La validation du protocole a été effectuée pour 3 types de dioxyde de titane commerciaux (Millenium PC500, Kronos 7000 et Kronos 7050) ayant été irradiés aux UV pendant plusieurs heures préalablement à la filtration. Des membranes Millipore en ester de cellulose ($d = 47 \text{ mm}$, $\phi = 0,45 \text{ }\mu\text{m}$) ont été utilisées pour les filtrations tout au long de nos travaux. Les filtrations ont été réalisées sur une rampe à trois postes reliée à une fiole d'évacuation de 5 l elle-même reliée à une pompe (Figure 2.10). Le TiO_2 en suspension a été testé avec une suspension de cellules *E. coli* et avec une suspension de spores de *B. Pumilus*, ajustées à environ 10^2 UFC/ml .

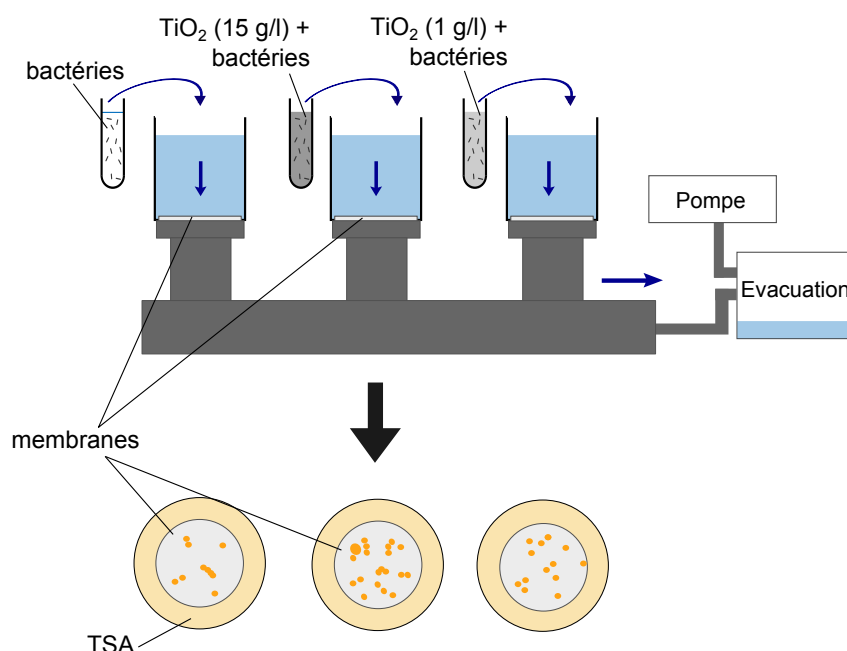


Figure 2.10 – Schéma de principe de la validation du protocole de filtration

Pour chaque configuration, 1 ml de chacune des trois suspensions (bactéries seules, bactéries + TiO_2 (15 g/l) et bactéries + TiO_2 (1 g/l)) a été transféré dans des entonnoirs de filtrations avec environ 30 ml d'eau distillée stérile pour filtration. Les cuves ont ensuite été rincées deux fois à l'eau distillée stérile. Les membranes ont été délicatement récupérées et placées sur gélose TS en boîte de Petri pré-coulées. Les boîtes ont ensuite été incubées à $36 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 48h pour la lecture. Les limites d'acceptation de comptage sur membrane étaient comprises entre 14 et 165 UFC.

2.6.3 Protocole expérimental

L'ensemble de la procédure d'essai proprement dit est schématisé sur la Figure 2.11.

Au total 3 configurations sont testées par essai : une configuration à $T=0\text{h}$, pour validation de la neutralisation et de la récupération, une configuration maintenue dans le noir pendant la durée de l'essai et une configuration irradiée aux UV. Pour chaque configuration, 3 échantillons témoins sans TiO_2 et 3 échantillons avec TiO_2 sont testés. Les échantillons sont placés dans les boîtes de Petri en borosilicate et sont inoculés avec 400 μl de la suspension d'essai. Les

échantillons $T=t$ sont incubés en conditions de test, selon les configurations dans le noir / irradié aux UV, et les échantillons $T=0h$ sont immédiatement neutralisés et récupérés. Après une période de test t désirée, les échantillons d'essai sont récupérés de la même manière. Les géloses TS sont incubées à 36°C pendant 48h avant dénombrement des UFC.

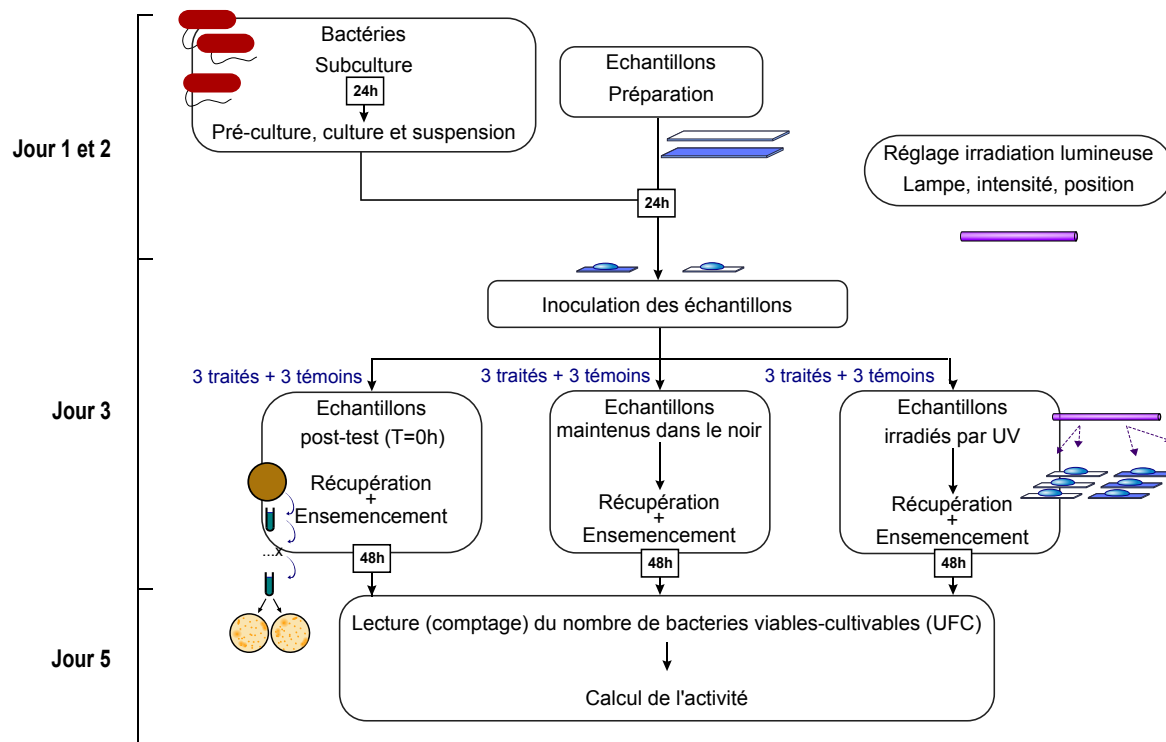


Figure 2.11 – Organigramme du protocole de test : Activité antibactérienne. Adapté de ISO 27447 (2009)

2.7 Évaluation de l'activité antibactérienne en suspension

2.7.1 Essai réalisé dans les conditions de la JIS Z 2801

Afin d'évaluer certains facteurs d'influence de la méthodologie sur l'efficacité de la photocatalyse, des essais d'évaluation de la cinétique d'inactivation bactérienne ont également été réalisés en suspension aqueuse sous agitation magnétique. Cette approche a déjà été menée dans la littérature (Gogniat *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 1992). Elle permet d'évaluer la cinétique d'inactivation assez rapidement, contrairement à l'essai en boîte de Petri, par prélèvement d'aliquots à différentes échéances directement à partir de la suspension testée.

Les conditions d'essai sont les mêmes que pour l'évaluation de l'activité antibactérienne en boîte de Petri, c'est-à-dire :

- une température ambiante (25°C)
- des temps de contact plus courts
- un seul micro-organisme : *E. coli*

Les résultats présentent le nombre de bactéries viables cultivables survivantes en terme d'UFC.

2.7.1.1 Configuration de l'essai

L'essai est entièrement réalisé sous PSM. Des suspensions bactériennes sont disposées dans des béchers et placées sur des agitateurs magnétiques, schématisés sur la figure 2.12. Afin d'éviter l'évaporation durant l'expérience, les béchers sont recouverts de couvercles en borosilicate.

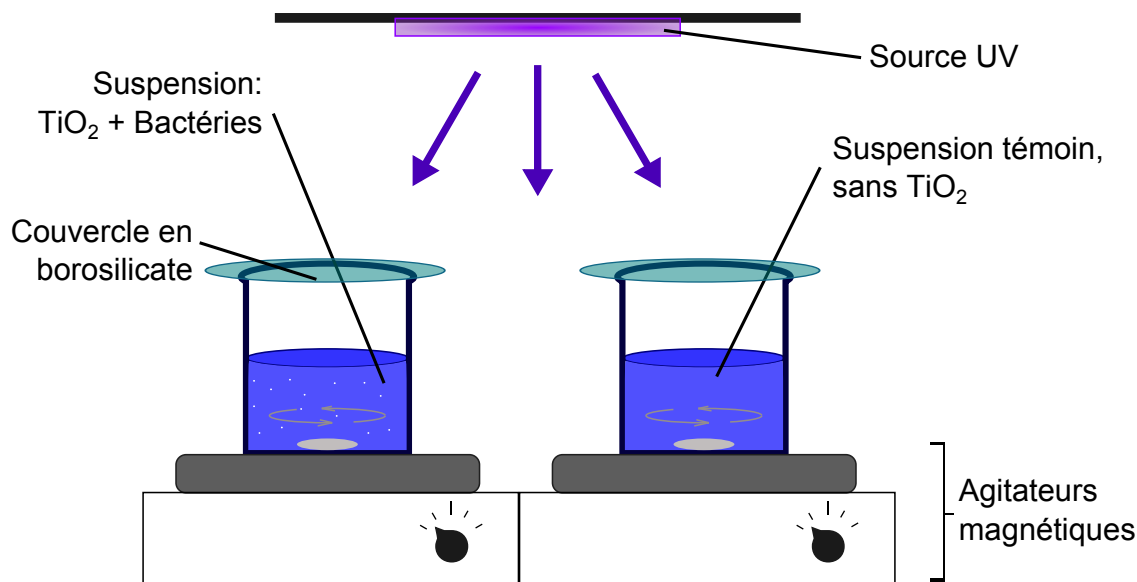


Figure 2.12 – Schéma de principe de l'essai cinétique d'inactivation bactérienne

2.7.1.2 Irradiation lumineuse

Dans le but de compenser un éventuel effet de filtration des UV par la suspension test, la configuration est ajustée de manière à obtenir une irradiance de 5 W/m^2 sur les échantillons pendant la durée totale de l'essai.

Un témoin sans TiO_2 est suivi en parallèle afin de s'assurer de l'innocuité du traitement UV sur les cellules.

2.7.1.3 Protocole expérimental

Des particules de titane sont mises en suspension dans un bécher avec 27 ml d'eau distillée stérile, ou du bouillon 1/500 NB, dépendamment du test. Puis, 3 ml de la suspension d'essai, préparée en 2.5, sont ajoutés pour réaliser la suspension test finale. Les concentrations ont été ajustées de manière à obtenir 1 g/l de TiO_2 et entre 7×10^4 et 1×10^5 UFC/ml de cellules bactériennes dans la suspension d'essai. Une suspension bactérienne témoin est également réalisée sans TiO_2 .

Au temps $t = 0h$, les béchers sont inoculés avec les suspensions bactériennes comme susmentionné, la lampe UV est allumée et les agitateurs sont mis en marche. Le protocole de récupération est présenté sur la figure 2.13. Un aliquot de 1 ml de chaque suspension est prélevé toutes les 30 min pendant 4 h. Les aliquots sont dilués successivement au 10^e dans du tampon phosphate jusqu'à obtenir un nombre d'UFC compris entre 30 et 300 (estimation). $2 \times 1 \text{ ml}$ de

chaque dilution sont ensemencés dans 2 boîtes de Petri contenant chacune 10 à 15 ml de TSA en surfusion. Après solidification, les boîtes sont incubées à 36 °C pendant 48 h pour comptage des UFC.

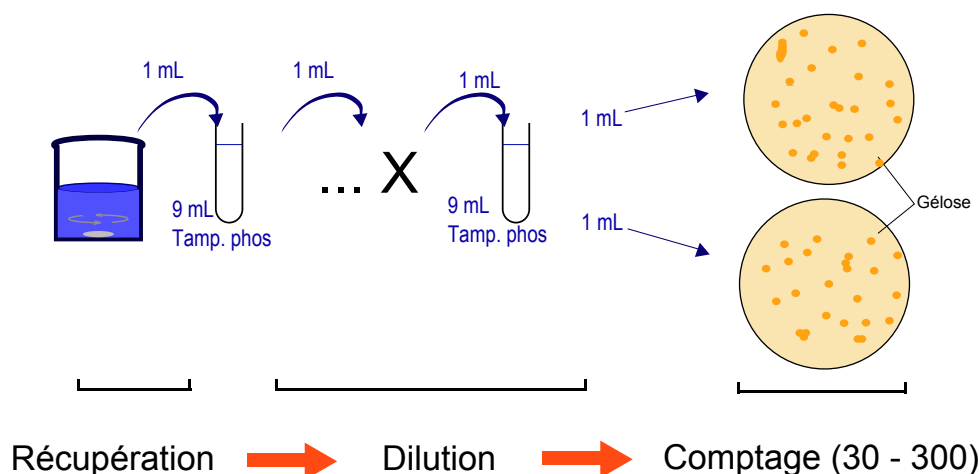


Figure 2.13 – Schéma de principe de l'essai cinétique d'inactivation bactérienne

Pour des raisons matérielles, un seul échantillon a été lancé par essai. Les résultats présentés sont la moyenne de trois essais réalisés dans les mêmes conditions.

2.7.2 Essais de bactéricidie selon la norme NF EN 1040

Le mode opératoire de l'essai est décrit dans la norme NF EN 1040 (2006). Le principe de l'essai repose sur la mise en contact entre un produit et une suspension bactérienne dans un tube à essai placé au bain-marie à température contrôlée pendant un temps t relativement court (quelques minutes). L'objectif est de déterminer la puissance bactéricide d'un agent chimique.

Trois vérifications témoins sont requises pour mener ce type d'essai :

- (A) la validation des conditions expérimentales,
- (B) la validation de la filtration,
- (C) la validation de l'arrêt du contact par filtration.

Ces trois vérifications sont menées pour chaque manipulation, en parallèle à l'essai.

2.7.2.1 Préparation de la suspension d'essai

La suspension d'essai (N) a été préparée avec *E. coli* de la façon détaillée en 2.5. Elle est ajustée entre $1,5 \times 10^8$ et 5×10^8 UFC/ml. La dilution 10^{-5} de la suspension d'essai est utilisée comme suspension de validation (N_v). Elle servira à inoculer les témoins de validation. Sa concentration est estimée autour de $1,5 \times 10^3$ UFC/ml.

Une solution d'essai du produit à tester est préparée à une concentration égale à 1,25 fois la concentration souhaitée pour le test.

2.7.2.2 Déroulement de l'essai

Le déroulement de l'essai est schématisé sur la figure 2.14.

1 ml de la suspension d'essai (N) est transféré avec 1 ml d'eau distillée stérile dans un tube à essai qui est placé au bain marie à 20°C pendant 2 minutes. Après ce temps, 8 ml de la solution produit sont transférés dans le tube. Après mélange au vortex, le tube est à nouveau placé dans le bain-marie. À l'issue du temps t choisi, 1 ml du mélange d'essai est prélevé et, au besoin, dilué en série au 10^e dans de l'eau stérilisée pour préparation injectable (PPI). 2×1 ml des dilutions appropriées sont filtrés sur membranes en ester de cellulose. Les membranes sont ensuite déposées sur des boîtes de Petri gélosées (TS) puis incubées à 36°C pendant 48h avant dénombrement des UFC.

Les témoins de validation sont réalisés au cours de l'expérience, de la manière suivante :

Témoin des conditions expérimentales "A" : l'essai ci-dessus est reproduit avec 1 ml de suspension bactérienne de validation (N_v) et 9 ml d'eau PPI, sans produit à tester.

Témoin de filtration "B" : $2 \times 0,1$ ml de la suspension de validation (N_v) sont directement transférés dans deux entonnoirs de filtration distincts avec de l'eau distillée stérile. Après filtration, les membranes sont également déposées sur gélose TS et incubées à 36°C jusqu'au comptage des UFC.

Validation de la neutralisation par filtration du produit, "C" : un tube à essai avec la solution du produit est placé au bain-marie dans les mêmes conditions que pour le test. A l'issue du temps t , $2 \times 0,1$ ml sont prélevés et filtrés dans deux entonnoirs distincts remplis avec de l'eau PPI. Puis, $2 \times 0,1$ ml de la suspension de validation (N_v) sont filtrés sur les mêmes membranes. Les membranes sont alors déposées sur gélose TS et incubées à 36°C jusqu'au comptage des UFC.

Le Tableau 2.8 présente un récapitulatif des nombres de cellules par ml des différents mélanges d'essai.

	Nb de cellules/ml dans les suspension bactériennes	Nb de cellules/ml dans les mélanges d'essai au début du temps de contact	Nb de cellules/ml dans les mélanges d'essai à l'issue du temps de contact t
Essai	N	$N_0 (= N/10)$	N_a
	Suspension d'essai		
Témoins	N_v	$N_{v0} (= N_v/10)$	A, B, C
	Suspension de validation		

Tableau 2.8 – Nombre de cellules par ml des différents mélanges d'essai (NF EN 1040, 2006)

Les conditions expérimentales sont validées si les nombres d'UFC pour ces échantillons témoins (A, B, C) sont supérieurs ou égaux à la moitié de la concentration de la suspension de validation ($\geq 0,5 \times N_{v0}$). Dans le cas contraire, l'essai est considéré comme invalide et les résultats ne sont pas pris en compte.

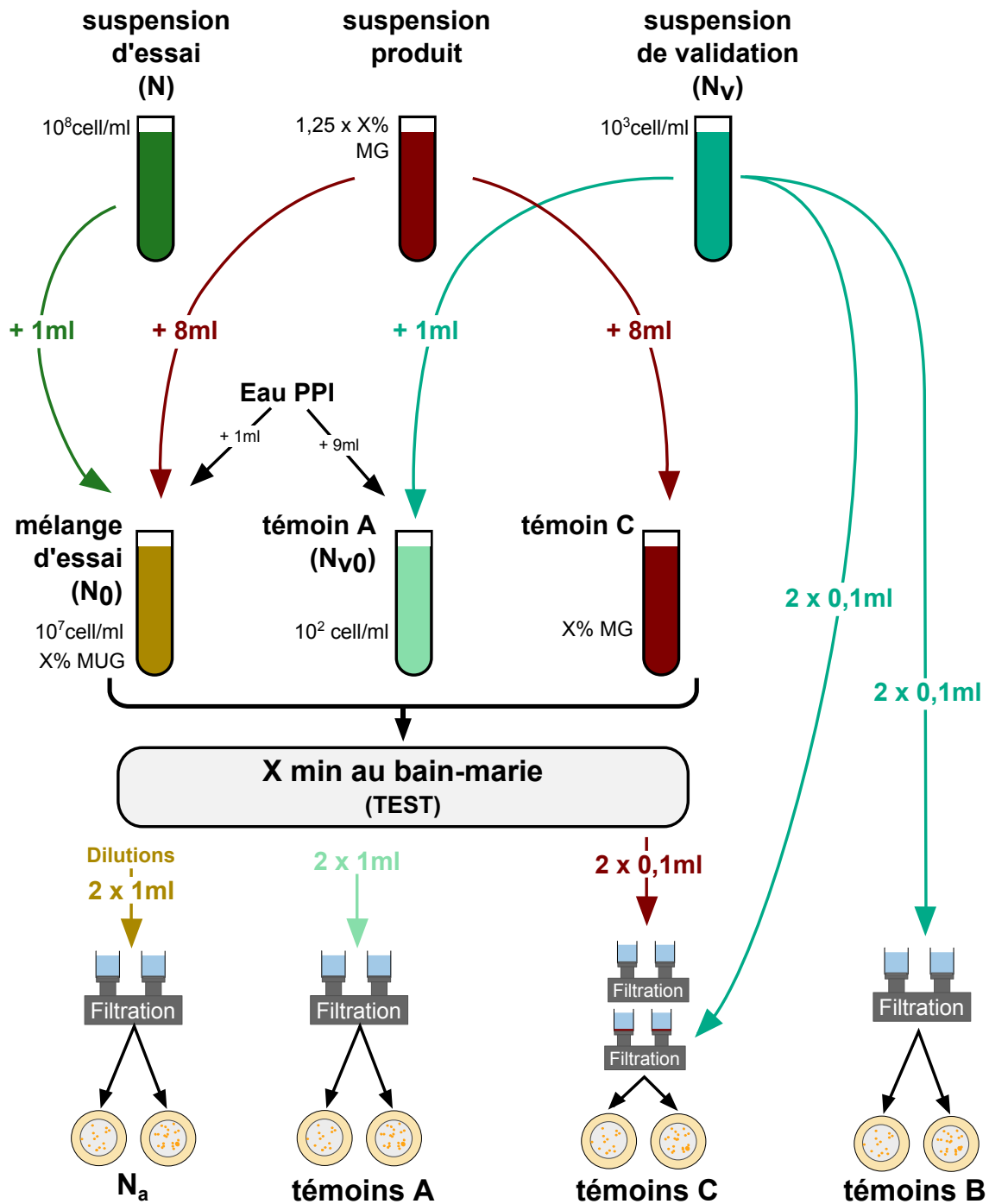


Figure 2.14 – Organigramme du protocole de test de bactéricidie. Eau PPI = Eau Pour Préparation Injectable

2.7.2.3 Taux de réduction

Le taux de réduction R est exprimé sous forme logarithmique comme la différence entre le nombre de bactéries dans le mélange d'essai au début du temps de contact et le nombre de bactéries dans le mélange d'essai au terme du temps de contact t :

$$R = \log \left(\frac{N_0}{N_a} \right) \quad (2.4)$$

Les résultats présentés sont une moyenne de 4 essais réalisés dans les mêmes conditions.

2.8 Résistance à la formation de biofilm

Le biofilm est le mode de croissance le plus répandu chez les micro-organismes. Cette organisation communautaire au sein d'une matrice de polymères leur confère une résistance vis-à-vis des agressions extérieures et leur permet d'assurer la colonisation pérenne d'un substrat.

Les essais de biofilms sont communément réalisés en microbiologie, dans le domaine médical notamment (matériel, prothèses,...) ou pour évaluer les performances de matériaux antibactériens. Dans le domaine du Génie Civil, les évaluations de contamination microbienne, vues dans le chapitre 1, traitent indirectement des biofilms puisqu'il s'agit principalement de grandes communautés microbiennes, ayant eu le temps de croître pendant plusieurs jours, voire plusieurs mois. A notre connaissance, il n'y a pas encore d'étude de la formation de biofilm, de la phase d'adhésion à la phase de structuration, sur matériaux de construction, comme les matériaux cimentaires, sur des périodes de temps aussi courtes (24h).

L'essai est réalisé en milieu aqueux, dans des microplaques multi-puits. Les matériaux sont plongés dans un bouillon dit minimum, qui place les bactéries en état de stress, favorisant la croissance sessile et la production d'un biofilm plutôt que le développement planctonique. Après un certain temps d'incubation, le biofilm est récupéré par grattage des échantillons et la concentration bactérienne est évaluée en terme d'UFC/cm².

2.8.1 Configuration

Les cylindres de pâte de ciment préparés en 2.2.3.1 sont disposés dans des microplaques 6 puits (Figure 2.15). Au cours de l'essai, une microplaque est maintenue dans le noir tandis qu'une autre est irradiée aux UV à environ 4 W/m². Quatre configurations sont donc lancées de front, avec 3 échantillons par configuration : lasure photocatalytique / lasure témoin ; maintenus dans le noir / irradiés aux UV.

2.8.2 Déroulement de l'essai

Les étapes du déroulement de l'essai sont schématisées sur la figure 2.16, page 98. Les puits contenant les échantillons de pâte de ciment sont remplis avec 6 ml de BBM ramené à température ambiante, avant d'être inoculés avec 300 µl de la suspension d'essai préparée en 2.5 et dosée à environ 10³ UFC/ml. Les microplaques sont ensuite incubées à 32°C avec ou sans UV pendant 24h.

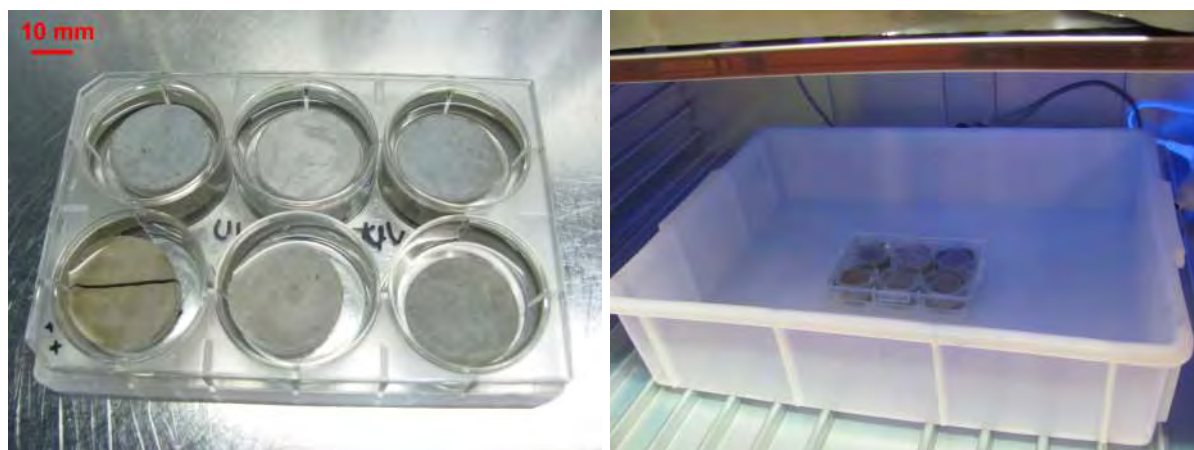


Figure 2.15 – Photo des micro-plaques 6 puits avec échantillons utilisées pour l’essai Biofilm.

Afin de maintenir la population planctonique des bactéries au niveau le plus faible et favoriser la multiplication sous forme sessile, les puits sont vidés, rincés à l’eau distillée stérile (2 fois) et le milieu BBM est renouvelé à $t = 4, 6$ et $24h$. Après le dernier rinçage à $24h$, les échantillons sont transférés dans de nouvelles microplaques, ce qui permet d’éviter de détacher accidentellement du biofilm qui aurait pu se développer sur les parois des microplaques.

6 ml de tampon phosphate sont ensuite ajoutés dans chaque puits et les échantillons sont délicatement grattés à l’aide d’une spatule métallique pendant 30 sec (stérilisation entre chaque échantillon par trempage dans de l’éthanol et flambage). Après homogénéisation par quelques allers-retours à la micropipette, la suspension est diluée au 10^e en série dans de l’eau distillée stérile.

2×1 ml des dilutions appropriées sontensemencés par inclusion dans de la gélose en surfusion ($45^\circ C$). Les boîtes gélosées sont ensuite incubées à $36^\circ C$ pendant 48h jusqu’au dénombrement des UFC. Les résultats sont présentés en terme d’UFC/cm².

Une attention particulière doit être apportée à la manipulation des échantillons lors des différentes étapes de l’essai. Dans nos travaux, les cylindres de pâtes de ciment ont été fragilisés par les différentes étapes de vieillissement accéléré (lixivation, carbonatation, irradiation aux UV) et un certain nombre d’échantillons s’est brisé au cours des tests en microplaques.

2.8.3 Microscopie à épifluorescence

La microscopie à épifluorescence a été utilisée comme méthode d’évaluation rapide de la colonisation bactérienne à la surface d’échantillons. Le Syto9® a été utilisé comme fluorochrome afin de marquer le biofilm bactérien. Il s’agit d’un intercalant de l’ADN qui pénètre au travers des membranes endommagées aussi bien qu’au travers des membranes intactes. Il ne permet donc pas de faire la distinction entre les cellules viables et les cellules mortes mais rend compte d’une vision globale de la population fixée au substrat. La gamme de fréquences d’excitation du Syto9 est située autour de 470-520 nm. La gamme d’émission est située entre 510 et 540 nm.

Les observations ont été effectuées avec un microscope Carl Zeiss Axio Imager-M2 équipé pour l’épifluorescence d’une source lumineuse HXP 200C et de filtres Zeiss 09 (HP450r HP450200

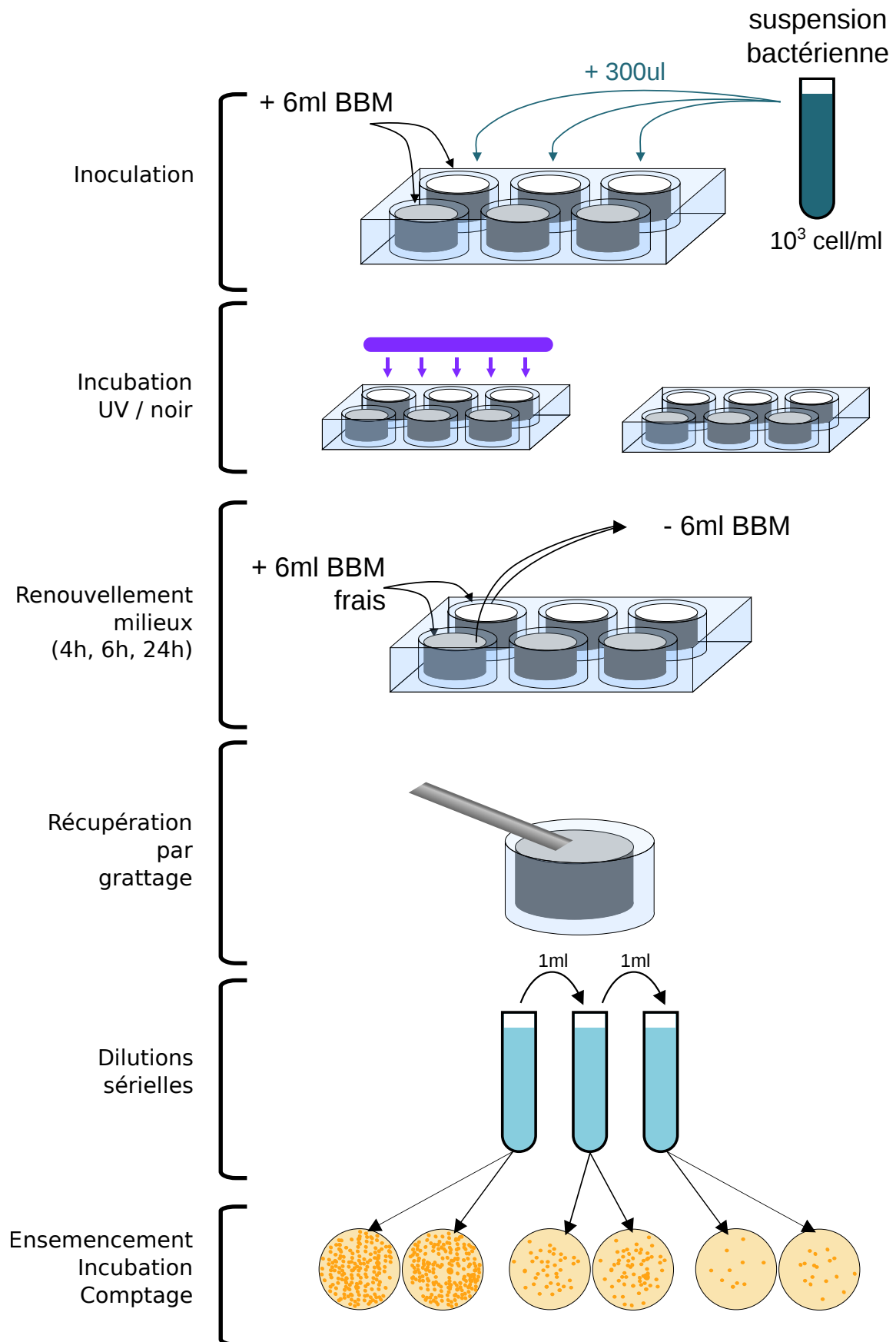


Figure 2.16 – Schéma du protocole d'essai de résistance à la formation de biofilm

C). Les images ont été acquises avec un appareil photo numérique (Zeiss AxioCam MRM) tous les 0,5 mm le long de l'axe Z et l'ensemble des images a été transformé à l'aide du logiciel Zen®.

Quelques précautions doivent être prises pour la réalisation de ces observations : les matériaux utilisés comme substrat ne doivent pas émettre dans les mêmes longueurs d'ondes que les bactéries et, pour les matériaux cimentaires, les observations doivent être réalisées en milieu aqueux. En effet, le phénomène de carbonatation des matériaux cimentaires peut entraîner la formation d'une couche de carbonate de calcium qui émet une lumière fluorescente empêchant toute observation.

2.8.4 Microscopie électronique à balayage

Les observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont été réalisées sur deux appareils : un MEB FEG FEI Quanta 250 et un appareil type JEOL JSM-6380 LV couplé à un spectromètre de dispersion d'énergie (EDS) (Röntec XFlash®3001). Les observations ont été réalisées à 5 kV ou 15 kV en vide poussé.

Pour les observations de micro-organismes, la fixation a été réalisée en immergeant les échantillons dans une solution de glutaraldéhyde concentrée à 2,5% pendant 24h. Avant observation, les échantillons ont été déshydratés par bains successifs dans l'alcool puis séchés par dessiccation à l'HMDS (hexaméthylidisylasane).

2.9 Évaluation de la prolifération microbienne par contamination naturelle

2.9.1 Mise en œuvre de l'essai

L'objectif de cet essai est d'évaluer la résistance à la contamination et à la colonisation naturelle de matériaux de construction recouverts de monoglycérides (MG).

Des plaques de placoplâtre commerciales ont été découpées en échantillons de 5 × 10 cm. 3 échantillons ont été recouverts avec une solution aqueuse de MG concentrée à 20% au moyen d'un pulvérisateur manuel et laissés à l'air ambiant pour séchage. 3 échantillons témoins ont été utilisés sans revêtement. Aucune suspension bactérienne ou fongique n'a été préparée pour inoculer les échantillons. Le test a été lancé en laissant les 6 échantillons sans protection dans une chambre humide, à 100%HR, pendant 8 semaines. Après ce temps, les échantillons ont été scannés afin d'observer la colonisation naturelle en surface.

2.9.2 Analyse d'images

Des analyses ont été réalisées sur les clichés photographiés au cours d'un essai d'évaluation de la prolifération microbienne par contamination "naturelle", détaillé dans la partie 4.3 page 155 sur les esters de glycérol. Le pourcentage de surface colonisée des échantillons a été évalué par la méthode des nuées dynamiques, à l'aide du logiciel ImageJ et du module de segmentation des couleurs développé par Sage (2008). L'algorithme permet de répartir les pixels de l'image dans des classes définies par l'utilisateur. La figure 2.17 montre un exemple d'utilisation. L'image de

l'échantillon est divisée en 3 classes de couleurs : une qui représente la couleur de fond (échantillon non colonisé), et deux autres qui représentent deux couleurs de colonisation. Le pourcentage de surface colonisée est obtenue en divisant la somme du nombre de pixels des classes définies pour la colonisation par le nombre total de pixel.

Pour la numérisation des images, un scanner a été préféré à un appareil photo numérique car il garantit des conditions d'éclairement et de taille d'image identiques au cours du temps. Les surfaces d'échantillons ont été numérisées à une résolution de 600 dpi.

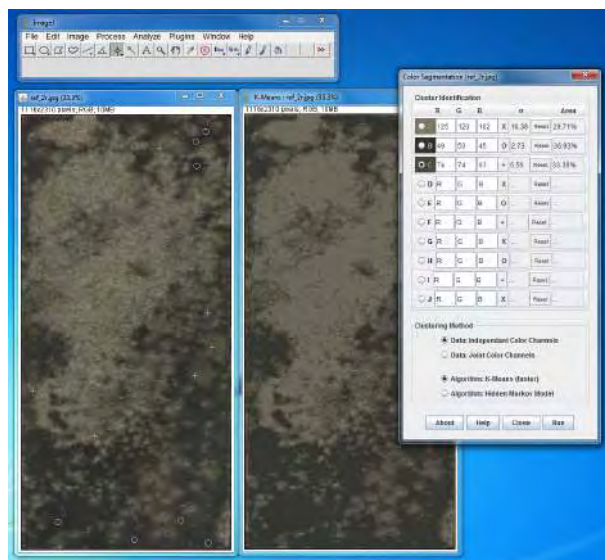


Figure 2.17 – Exemple d'utilisation du module *Color Segmentation* pour déterminer le pourcentage de surface colonisée.

2.10 Évaluation du caractère superhydrophile de surface photo-induit

Les angles de contact ont été mesurés sur le substrat par la méthode de la goutte sessile. Des gouttes d'eau distillée (15-20µl) ont été placées sur des échantillons recouverts de lasure et préalablement irradiés aux UV pendant différentes périodes de temps. Après différentes échéances de pré-vieillessement aux UV, les échantillons étaient sortis de la chambre de vieillissement pour effectuer les mesures, puis replacés sous irradiation jusqu'à la prochaine mesure. Les étapes sont schématisées sur la figure 2.18.

Les mesures ont été effectuées en conditions ambiantes (20°C, 60-80 % HR), en utilisant un goniomètre Digidrop de la société GBX Instruments. Les mesures ont été complètement automatisées à l'aide du logiciel de reconnaissance des formes (Digidrop), qui donne en même temps l'angle à droite et à gauche de la goutte sessile. L'angle de contact a été mesuré après stabilisation de la goutte sur la surface, selon la méthode décrite par Van Oss (2006, chap. 12). Pour cela, la chute de la goutte est enregistré en vidéo, permettant de détecter précisément le point de triple contact (eau-substrat-air) et mesurer Θ_a . En raison de l'irrégularité de certaines surfaces, les résultats présentés sont une moyenne de 6 à 12 gouttes d'eau placées à des endroits différents sur l'échantillon. En outre, du fait de la grande porosité de surface des matériaux de construction (ciment, mortier, placoplâtre, plâtre), les mesures ont été effectuées avec soin dans

le court laps de temps après la stabilisation de la chute de la goutte et avant son absorption par le substrat.

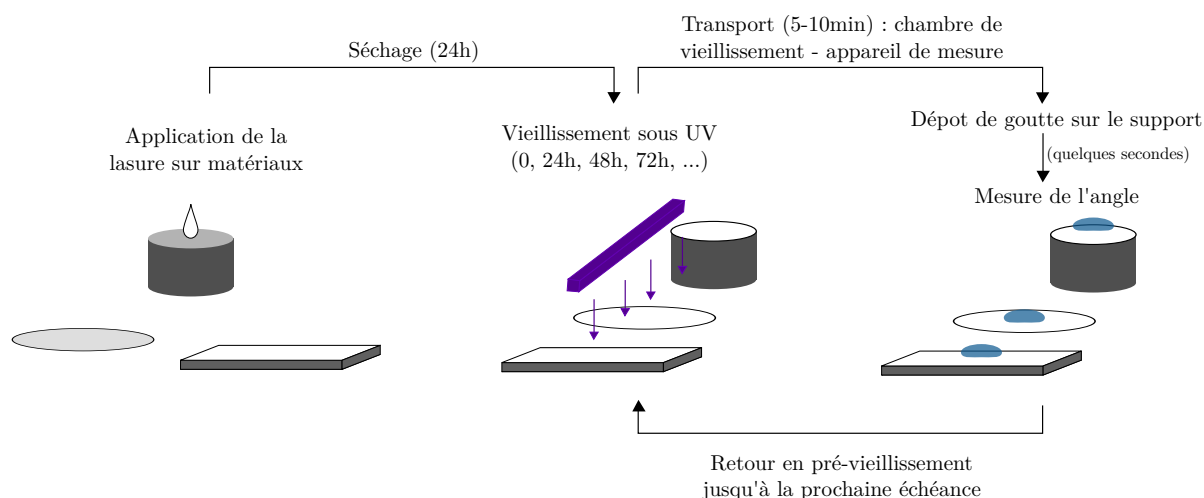


Figure 2.18 – Schéma de la procédure réalisée pour mesurer les angles de contact en fonction du temps de pré-vieillessement des échantillons par une irradiation UV.

2.11 Conclusion

Les méthodes d'évaluations microbiologiques ont été présentées en détail dans ce chapitre. Elles ont été adaptées afin d'évaluer les performances antimicrobiennes des particules de TiO_2 , des monoglycérides (MG) et des revêtements formulés.

La démarche méthodologique mise en œuvre dans cette étude est composée de trois types d'évaluation :

- la mesure de l'activité antibactérienne des matériaux, au moyen de tests en boîtes de Petri et en suspension aqueuse,
- l'évaluation de la résistance à la formation de biofilm, menée sur des matériaux de construction en condition aqueuse,
- l'évaluation de la prolifération microbienne, menée sur des matériaux de construction, par contamination aérienne naturelle.

Le chapitre suivant présente les résultats des performances antibactériennes des particules de TiO_2 dans différentes conditions expérimentales. L'influence des paramètres méthodologiques sur l'activité antibactérienne est étudiée en détail.

2.12 Annexe

2.12.1 Synthèse des essais mis en place et des matériaux testés

	ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE		FORMATION DE BIOFILM	PROLIFÉRATION MICROBIENNE PAR CONTAMINATION NATURELLE	HYDROPHOBIE DE SURFACE
	Selon JIS Z 2801 et ISO 27447	En suspension Conditions JIS Z 2801 Bactéricidie, NF EN 1040			
Particules de TiO ₂	X	X			
Lasures photocatalytiques avec silicates	X				
Lasures photocatalytiques sans silicates	X				X
Lasure sur pâte de ciment			X		X
Ester de glycérol	X	X			
Ester de glycérol sur placoplâtre				X	

Figure 2.19 – Synthèse des différents essais mis en place en fonction des matériaux.

2.12.2 Protocole de coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique de coloration différentielle. Le principe repose sur la succession d'étapes de coloration et de rinçage de cellules bactériennes. En fonction du type de paroi, les colorants, généralement le cristal violet et la safranine, vont se fixer ou être évacués par rinçage à l'éthanol ou à l'acétone. Les bactéries à Gram positif gardent le cristal violet tandis que les bactéries à Gram négatif le perdent et se décolorent. Par la suite, l'ajout de safranine permet aux bactéries à Gram négatif de prendre une teinte rouge-rosée et laisse les bactéries à Gram positif en violet foncé (Figure 2.20). Il est important de noter qu'il s'agit d'une méthode "destructive". Les bactéries sont tuées au cours de la manipulation.

2.12.2.1 Procédure

- Prélèvement d'une oese bactérienne et dilution dans une goutte d'eau distillée stérile sur une lamelle de microscope,
- fixation des organismes : séchage sous PSM à l'air ambiant ou chauffage délicat de la lamelle d'observation par passages successifs au dessus d'un bec Bunsen. Bien veiller à ne pas stagner au dessus de la flamme (pour éviter toute carbonisation des cellules)
- coloration :

1. coloration au **violet de gentiane** (ou **cristal violet**) qui va se fixer sur les composants du cytoplasme (et donc colorer toutes les bactéries). **30 secondes**
 2. rinçage à l'eau distillée
 3. dépôt d'une solution d'iode (**lugol**), qui est un agent de mordançage et permet de fixer la coloration. **30 secondes**
 4. rinçage à l'eau distillée
 5. rinçage à l'**éthanol absolu**. Les bactéries à Gram négatif se décolorent.
 6. contre coloration à la **safranine**, colorant rose, qui va s'insérer sur toutes les bactéries. Seules les bactéries qui ne sont pas colorées en violet vont prendre une teinte rosée **60 secondes**
 7. rinçage à l'eau du robinet.
 8. séchage de la lame à l'aide d'un papier absorbant. Bien veiller à tamponner sans frottement latéral (risque d'enlever les microorganismes)
- observation des résultats au microscope optique avec un objectif à immersion d'huile.

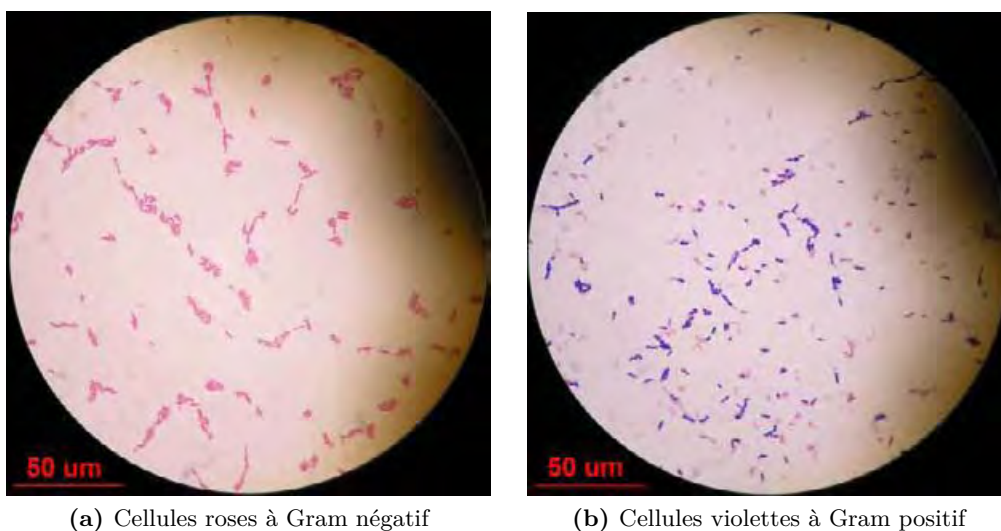


Figure 2.20 – Photographies au microscope optique (x100) de cellules après une coloration de Gram.

Chapitre 3

Analyse de l'efficacité et des paramètres méthodologiques d'influence de l'activité antibactérienne photocatalytique

Sommaire

3.1	Introduction	106
3.2	Validation des protocoles de neutralisation et de récupération	107
3.3	Effet des particules photocatalytiques dans le noir	107
3.4	Évaluation de l'efficacité des particules photocatalytiques et effet du contact particules/bactéries	113
3.4.1	Premiers essais - 2h de contact	113
3.4.2	Méthode	115
3.4.3	Résultats	115
3.5	Influence de la nature du milieu : essai d'activité antibactérienne en suspension	118
3.5.1	Méthodes	119
3.5.1.1	Validation de l'étape de neutralisation	119
3.5.1.2	Déroulement de l'essai	119
3.5.2	Résultats	120
3.6	Conclusion	125

3.1 Introduction

Les recherches sur l'activité antimicrobienne par le biais de réactions photocatalytiques ont souvent indiqué de très grandes efficacités microbicides, c'est à dire généralement plusieurs log en quelques minutes d'expérimentation. Néanmoins, il est nécessaire de rappeler que les résultats de ces études ont été obtenus dans des conditions de laboratoire la plupart du temps très éloignées des conditions réelles. Quelques-uns des principaux facteurs d'influence de la réaction photocatalytique ont été évoqués dans le chapitre 1, tels que la nature du catalyseur, la taille des particules, l'énergie photonique, etc. Mais d'autres paramètres, relatifs à la méthodologie et aux conditions d'essai, sont susceptibles d'influencer significativement l'efficacité de l'activité antimicrobienne photocatalytique.

Ce chapitre présente un travail relatif au développement de revêtements photocatalytiques formulés à base de particules de TiO_2 . Il s'agit d'une étape amont qui vise notamment à s'affranchir des effets du liant sur les particules et la réaction photocatalytique. A ce titre, la première étape de nos travaux a été d'explorer les différents paramètres qui gouvernent l'efficacité du TiO_2 lorsqu'il est utilisé seul comme agent antibactérien, au travers d'essais basés sur les normes JIS Z 2810 et ISO 27447. Le principal objectif du chapitre est de mettre en avant ces paramètres méthodologiques, trop souvent négligés, mais qui peuvent être un véritable frein aux applications industrielles du procédé.

De manière générale en microbiologie, les mesures de propriétés antibactériennes d'un produit reposent sur un principe commun : la mise en contact entre des bactéries et un produit à tester. Aussi, lors de l'utilisation de méthodes d'analyse basées sur la culture, la quantification repose le plus souvent sur le comptage du nombre de bactéries à $t=0$, et après un certain temps de contact. Dès lors, il est nécessaire de mettre en place une étape de neutralisation et/ou de séparation des deux entités qui soit efficace, afin de ne pas laisser perdurer un éventuel effet antibactérien pendant les différentes phases de collecte (récupération des organismes, dilution, ensemencement) et pendant la croissance des micro-organismes en milieu de culture. La première partie de ce chapitre décrit ainsi l'étape de validation des méthodes de neutralisation qui ont été réalisées au cours des différents essais.

La deuxième partie décrit l'effet de différents dioxyde de titane commerciaux non activés (maintenus dans le noir) en contact avec des bactéries. Ces essais ont pour vocation d'identifier un éventuel effet antibactérien des particules elles-mêmes en dehors de tout phénomène photocatalytique. Une souche sous forme végétative et une souche sous forme de spores ont été testées. Réaliser une étude sur des spores permet d'obtenir une idée du degré d'efficacité de la méthode, car les spores sont généralement plus résistants que les cellules végétatives face aux agressions.

L'essai repose sur la mise en contact de bactéries et de particules dans une boîte de Petri placée dans le noir pendant 24h. La différence entre le nombre de bactéries en contact avec les particules et le nombre de bactéries dans une boîte témoin donne donc une information sur un éventuel effet antibactérien intrinsèque du TiO_2 .

Par la suite, le même type d'essai d'inactivation a été réalisé sur des temps plus courts, avec des particules de TiO_2 irradiées par une source UV. Un important facteur d'influence de

l'efficacité photocatalytique est mis en avant par cette expérience.

Du fait d'un mode d'action non sélectif de la photocatalyse, une large gamme de polluants peut être traitée par cette méthode. Cependant, la présence d'éléments organiques et d'ions dans le milieu de réaction peut aussi contribuer à en perturber l'efficacité sur les micro-organismes.

La dernière partie de ce chapitre traite de la nature de la suspension dans laquelle est conduite la photocatalyse. L'impact de la présence d'ions et d'espèces organiques venant perturber la réaction est exploré à travers un essai en suspension, sous agitation, conduit dans deux milieux différents.

3.2 Validation des protocoles de neutralisation et de récupération

Pour mémoire, la validation du protocole a été effectuée pour 3 types de dioxyde de titane commerciaux (PC500, VLP7000 et VLP7050, cf partie 2) ayant été irradiés aux UV pendant plusieurs heures préalablement à la filtration.

Le TiO_2 en suspension a été testé avec une suspension de cellules *E. coli* et avec une suspension de spores de *B. Pumilus*, ajustées à environ 10^2 UFC/ml.

Pour chaque configuration, 1 ml de chacune des trois suspensions (bactéries seules, bactéries + TiO_2 (15 g/l) et bactéries + TiO_2 (1 g/l)) a été filtré dans de l'eau distillée stérile.

Les membranes ont été placées sur gélose TS en boîte de Petri pré-coulées. Les boîtes ont ensuite été incubées à 36 °C pendant 48h pour la lecture.

Les résultats obtenus à partir de l'étape de validation de filtration (chap 2) sont présentés sur la Figure 3.1.

Pour *E. coli* et pour *B. pumilus*, on observe un nombre d'UFC similaire entre le témoin et les poudres (le taux de recouvrement est supérieur à 80%).

Ainsi, ces résultats attestent que l'étape de filtration est efficace. Les particules de TiO_2 semblent être séparées de manière convenable des bactéries. En effet, après cette étape de filtration, la survie des particules est équivalente entre les milieux contenant initialement des particules et le témoin sans particule. La filtration permet de stopper les éventuels effets antibactériens post-expérimentaux. La méthode de filtration a donc été validée dans le cadre de ces essais.

3.3 Effet des particules photocatalytiques dans le noir

Dans cette partie, l'évaluation de l'activité antibactérienne basée sur la JIS Z 2801 a pour objectif d'évaluer l'innocuité du TiO_2 dans le noir avant de procéder à l'étude sous irradiation. Les trois types de dioxyde de titane commerciaux (PC500, VLP7000, VLP7050) ont été testés avec des cellules d'*E. coli* et des spores de *B. pumilus* pendant 24h.

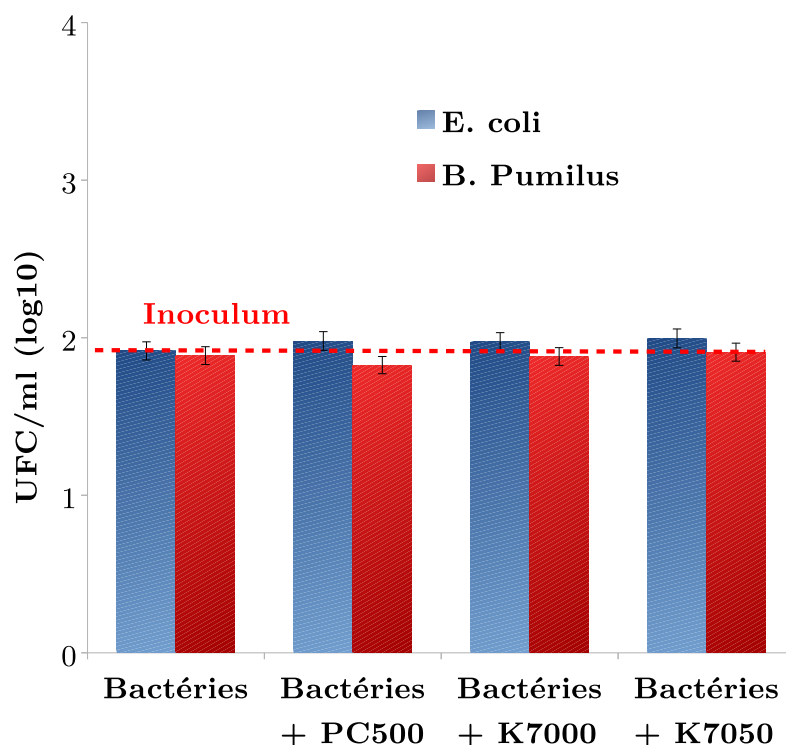


Figure 3.1 – Nombre de bactéries comptées sur membranes après l'étape de filtration sur trois poudres de TiO_2 commerciales : Millenium PC500, Kronos vlp7000, Kronos vlp7050.

La première partie de cette thèse se concentre sur l'évaluation des performances du TiO_2 seul, non inclus dans un revêtement et n'ayant pas subi de traitement ou de calcination pour être immobilisé.

Les essais réalisés dans cette partie sont basés sur des normes qui visent à évaluer les propriétés de supports solides. Dans notre cas, l'utilisation de poudres de TiO_2 a nécessité une préparation préalable, telle que décrite ci-dessous :

- du dioxyde de titane en poudre a été introduit dans de l'eau distillée stérile et mélangé au vortex pendant au moins 1 minute,
- après homogénéisation, une quantité suffisante pour recouvrir le fond d'une boîte de Petri a été prélevée et déposée (environ 10 ml),
- après séchage à l'air ambiant (sous Poste de Sécurité Microbiologique - PSM), une fine pellicule de TiO_2 s'est formée dans le fond des boîtes (Figure 3.2). La quantité de particule était d'environ 0,15 g par boîte pour une surface de $63,6 \text{ cm}^2$, correspondant à un dosage entre 2,4 et $2,5 \text{ mg/cm}^2$, du même ordre de grandeur que la quantité de TiO_2 sur les échantillons recouverts de lasure (CF chapitre 4).

Afin d'obtenir une contamination sur la totalité de la surface, les boîtes ont été inoculées avec 11 ml de suspension bactérienne et incubées en conditions de test (25°C) pendant 24h.

Après ce laps de temps, 1 ml de chaque suspension a été prélevé, dilué en série au 10^{e} et filtré sur des membranes en ester de cellulose. Les membranes ont été déposées sur des boîtes gélosées (TS) et incubées à 36°C pendant 48h.

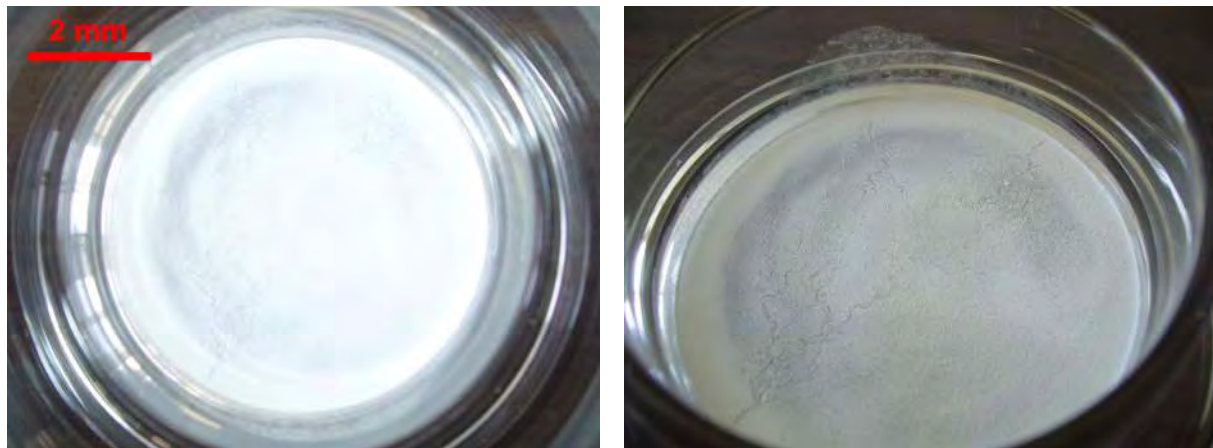


Figure 3.2 – Photographie d'une couche de TiO_2 déposée par sédimentation et séchage à l'air ambiant.

Les figures 3.3 et 3.4 présentent les valeurs moyennes du nombre d'UFC (log10) pour *E. coli* et les spores *B. pumilus* après 24h d'essai.

Concernant *E. coli* (Figure 3.3), aucune différence n'est observable entre le nombre de bactéries retrouvées sur témoins et le nombre de bactéries retrouvées sur les trois poudres à $t=0\text{h}$. Ces résultats confirment que la méthode de récupération des bactéries en contact avec des particules de TiO_2 est bien efficace et n'introduit pas de biais.

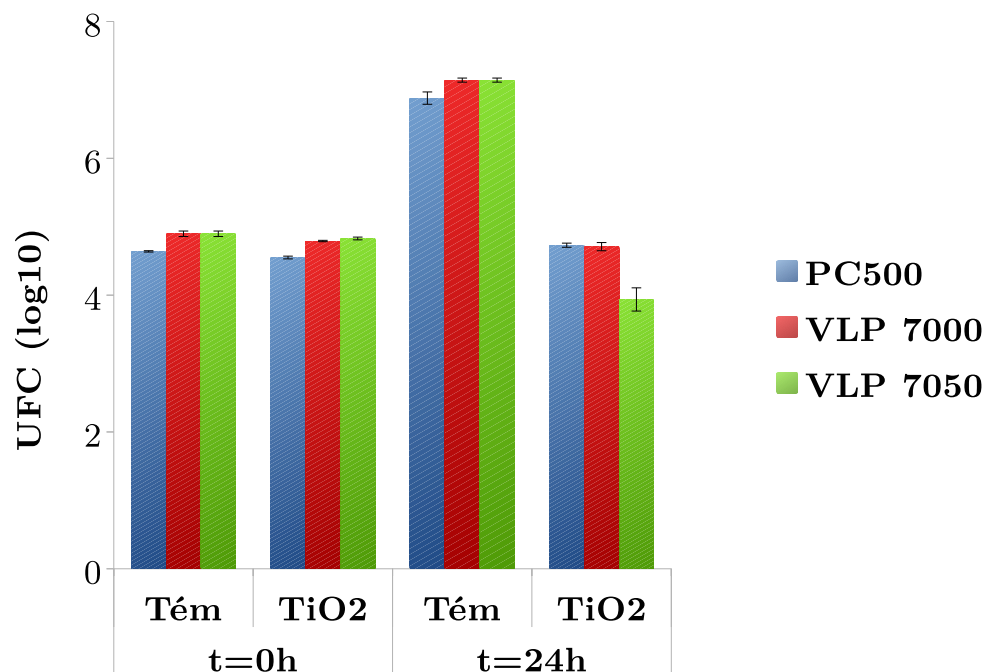


Figure 3.3 – Nombre d'UFC (log) de *E. coli* après 0h et 24h de contact à 25°C avec les trois poudres commerciales de TiO_2 dans le noir. Un essai par poudre, moyenne \pm es, $n=3$

Après 24h d'expérimentation, le nombre de bactéries sur les échantillons témoins est autour de 7 log, soit environ 50% d'augmentation par rapport à la concentration bactérienne à $t=0\text{h}$, pour les trois essais ($p<0,001$). Ces résultats indiquent une multiplication cellulaire durant les 24h d'essai à 25°C. Concernant le PC500 et le VLP 7000, aucune variation n'est détectable entre

les concentrations bactériennes à $t=0h$ et à $t=24h$. Une diminution du nombre de bactéries est observée avec le TiO_2 VLP 7050 mais n'est pas significative ($p>0,021$).

Concernant les spores de *B. pumilus* (Figure 3.4), à $t=0h$, les nombres de bactéries retrouvées sur les témoins sont semblables aux nombres de bactéries sur les différentes poudres de TiO_2 . Une légère diminution ($<10\%$) est observable aussi bien pour les échantillons témoins que pour les échantillons de TiO_2 après 24h de contact ($p<0,003$). On notera l'effet plus marqué (-15%) pour les échantillons avec le PC500.

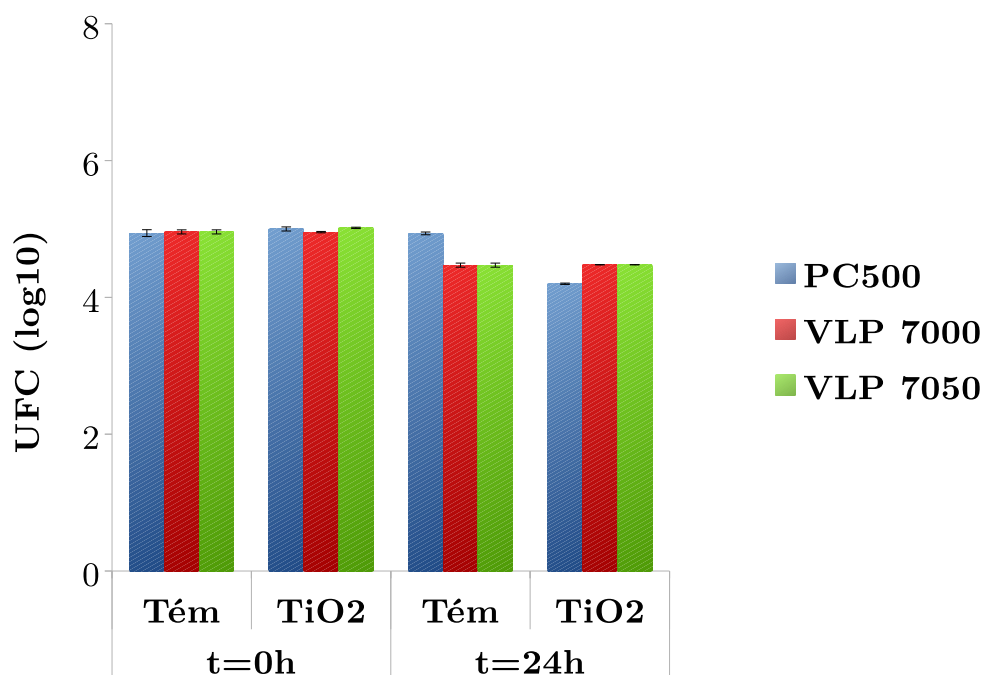


Figure 3.4 – Nombre d'UFC (log) de *B. pumilus* après 0h et 24h de contact à 25°C avec les trois poudres commerciales de TiO_2 dans le noir. Un essai par poudre, moyenne \pm es, $n=3$

Afin de quantifier le pouvoir antibactérien d'un matériau, l'activité antibactérienne est généralement utilisée dans la littérature. Elle se calcule comme la différence entre le nombre de bactéries retrouvées sur témoins et le nombre de bactéries retrouvées sur le matériau (en logarithme).

Les activités antibactériennes à 24h, correspondant aux essais effectués sur *E. coli* et *B. Pumilus*, sont présentées sur la Figure 3.5.

Les trois poudres présentent une différence au moins supérieure à 2 log sur les cellules d'*E. coli*. Toutefois, ces résultats ne sont pas suffisants pour conclure à un effet bactéricide. En effet, le nombre élevé de bactéries sur les témoins à 24h indique une croissance de *E. coli* pendant la période du test, ce qui n'est pas le cas sur les échantillons contenant les poudres de TiO_2 . Ainsi, cette différence traduit une activité des particules de TiO_2 uniquement sur la croissance des cellules bactériennes (effet bactériostatique).

Aucune activité des poudres de dioxyde de titane de Kronos n'est observée sur *B. Pumilus*. Le PC500 présente, quant à lui, une légère activité (0,74 log).

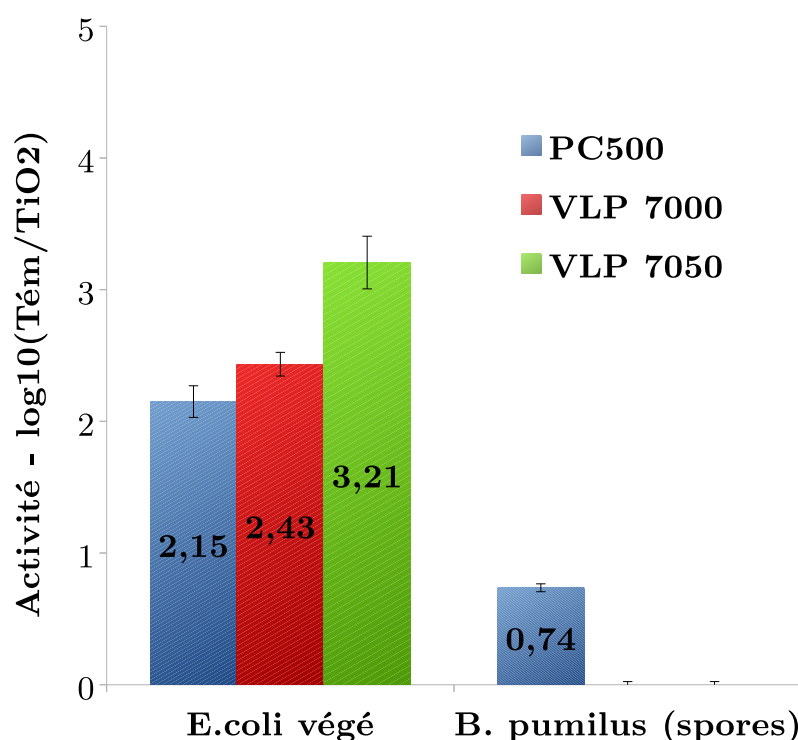


Figure 3.5 – Activité antibactérienne des différents TiO_2 dans le noir, après 24h de contact à 25°C (JIS Z 2801). Un test par poudre, moyenne \pm es, n=3

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont également observé une diminution du nombre d'UFC après un contact prolongé avec des nanoparticules de TiO_2 (Gogniat *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Les travaux de de Niederhäusern *et al.* (2013) sur des carreaux de céramique recouverts d'un revêtement Ag- TiO_2 montrent également des activités antibactériennes significatives après 24h dans le noir. Adams *et al.* (2006) relèvent une inhibition de croissance d'environ 30% après 6h de contact en suspension, sur *E. coli* et *Bacillus subtilis*. Daoud *et al.* (2005), travaillant sur des membranes en cellulose revêtues de film de nanoparticules de TiO_2 , constatent une réduction de 79% du nombre de cellules de *Staphylococcus aureus* après 5 heures de contact en suspension, dans le noir également.

Dans une autre étude, Ge *et al.* (2011) ont étudié l'écotoxicité de nanoparticules de titane dans des sols cultivés pour être microbiologiquement actifs (56 microorganismes recensés). Les essais consistaient à déposer une suspension de nanoparticules à différentes concentrations directement dans les sols. Après 15 et 60 jours de contact, les auteurs ont observé une relation dose-réponse négative entre les nanoparticules et l'ADN extractible du sol, c'est à dire une diminution de la quantité d'ADN avec l'augmentation du dosage en nanoparticules. Un test mesurant la respiration du sol (SIR, substrate-induced respiration) a confirmé cette relation.

Tous ces résultats semblent souligner l'importance de l'impact direct des particules de TiO_2 sur les cellules de *E. coli*, supposant une action physique plutôt que chimique.

Des observations au MEB des poudres de Kronos (non dispersées chimiquement) ont montré des amas de l'ordre du micromètre (chapitre 2, Figure 2.3, p. 78) et des agglomérats de taille comprise entre 600 nm et 700 nm pour le PC500 de Millenium Nu Hoai Nguyen *et al.* (2005).

Les trois poudres de TiO_2 sont formées de particules d'anatase à plus de 85% qui sont,

d'après la fiche technique, de taille comprise entre 10 et 15 nm. La surface spécifique du PC500 est légèrement supérieure à celle des produits Kronos (environ 350 m²/g contre 225 m²/g). Ces résultats pourraient être un élément d'explication à l'efficacité du PC500 contre les spores de *B. pumilus* contrairement aux autres produits. A ce stade d'étude, les variations d'activité entre les différentes particules étudiées sur les spores de *B. pumilus* autant que sur *E. coli* sont difficilement explicables, des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour approfondir la question.

On peut toutefois noter que les activités observées sont supérieures sur les cellules végétatives que sur les spores, ce qui confirme la classification de résistance généralement reconnue entre ces deux formes cellulaires.

Dans un autre contexte, une étude de Gurr *et al.* (2005) a rapporté des dommages oxydatifs sur des cellules épithéliales bronchiques humaines provoqués par des nanoparticules de TiO₂ (anatase) dans le noir. Selon l'étude, la taille des nanoparticules aurait une influence sur l'activité. Pour des tailles de 10 et 20 nm, les auteurs ont montré (i) des dommages oxydatifs sur l'ADN (mesurée par le test des comètes¹), (ii) la peroxydation des lipides (mesuré par relargage de MDA²) et (iii) la formation de micronoyaux (par observation au microscope optique). Ces dégâts n'ont pas été observés avec des particules d'anatase de 200 nm mais des effets oxydatifs ont été détectés avec des particules de rutil de 200 nm. Les effets sont encore plus marqués avec une combinaison anatase-rutil mais pas autant qu'avec les particules d'anatase de 10 et 20 nm. Les auteurs précisent toutefois que la dégradation oxydative de l'ADN n'est pas irréversible et qu'avec un peu de temps les cellules sont capables de se reconstruire (pour toutes les tailles de particules). Le rôle important de la taille des particules dans l'activité photocatalytique est suggéré. Cependant, l'analyse de la distribution des nanoparticules a montré des agglomérats de 1 µm de diamètre avec les particules de 10 et 20 nm et aucune agglomération avec les particules de 200 nm. Ces informations doivent toutefois être prises avec précaution puisque il s'agit de cellules humaines et non bactériennes, ce qui peut entraîner des réponses différentes. Si les résultats sur des cellules bactériennes ne sont pas comparables, il est quand même intéressant de ne pas écarter la possibilité d'une action chimique, même mineure, des particules dans le noir.

Dans le but d'évaluer l'action du TiO₂ en milieu de culture (TSA³), des bactéries en contact avec des particules de TiO₂ (0,1 g/l et 1 g/l) ont étéensemencées directement (sans dilution) sur gélose TS et incubées pendant 48h. Aucune différence n'a été détectée entre le nombre d'UFC sur les échantillons où les bactéries étaient en contact avec le TiO₂ et le nombre d'UFC sur les échantillons témoins sans TiO₂ (Figure 3.6). L'inclusion en gélose semble suffisante pour stopper l'effet antibactérien.

De tels effets de "neutralisation" des milieux de culture sont également observés avec certaines molécules antiseptiques et désinfectantes (Allion, 2004), ce qui met en évidence le rôle des conditions du test sur l'évaluation de l'efficacité.

L'activité antibactérienne détectée dans le noir pourrait être de nature physique, liée à un effet mécanique sur les cellules, tel que l'ingestion directe des particules, par le contact avec

1. Le test des comètes est une mesure indirecte des processus enzymatiques de réparation des dommages couplée à une mesure de processus secondaires de fragmentation de l'ADN

2. Malondialdéhydes, CF partie 1.3.2

3. Triptocaséine Soja Agar

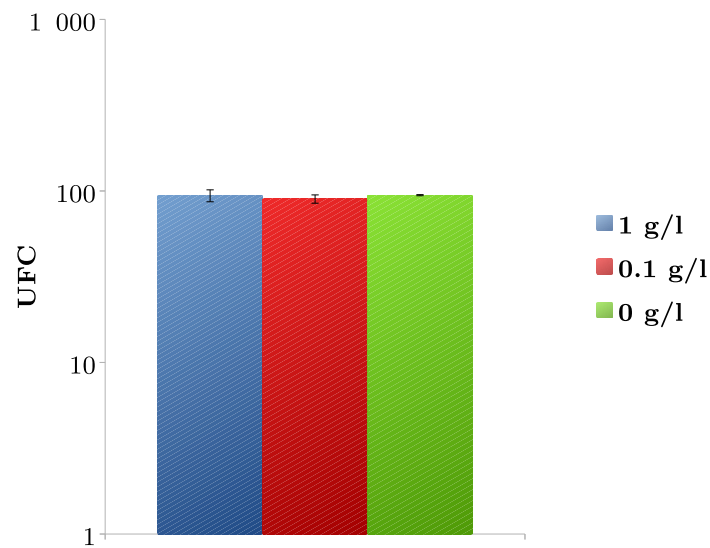


Figure 3.6 – Nombre d'UFC en fonction du dosage en TiO_2 . Un test par concentration, moyenne \pm es, $n=2$.

celles-ci. Cela a été également souligné par d'autres auteurs (Caballero *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 1991).

La partie suivante présente les essais réalisés pour analyser l'influence du paramètre contact entre particules photocatalytiques et micro-organismes sur l'efficacité d'inactivation bactérienne. Les essais ont été réalisés dans le noir et sous irradiation UV. Pour la suite des travaux, l'ensemble des tests a été effectué avec la souche bactérienne *E. coli*.

3.4 Évaluation de l'efficacité des particules photocatalytiques et effet du contact particules/bactéries

Les premiers essais antibactériens ont été réalisés sur TiO_2 seul afin d'évaluer son efficacité propre avant inclusion en lasure. L'objectif principal était d'avoir une idée de ses propriétés antimicrobiennes des particules seules pour pouvoir les comparer par la suite avec les propriétés des lasures et ainsi discriminer l'effet des particules de celui du revêtement.

Les premiers essais montrant un effet antibactérien limité, des modifications dans la méthodologie ont été réalisées et ont permis par la suite de mettre en évidence un facteur fondamental de l'efficacité photocatalytique : le contact bactéries - particules.

3.4.1 Premiers essais - 2h de contact

Quatre essais ont été réalisés (2 sur *E. coli* et 2 sur spores de *B. pumilus*) avec une pellicule de poudre de TiO_2 déposée par sédimentation et séchage dans les boîtes en borosilicate (cf partie 3.3).

Par la suite, les boîtes ont été inoculées avec 1 ml de suspension bactérienne dosé à $2,5-5 \times 10^5$ UFC/ml, placées sous PSM et irradiées par une lumière UV ($4-5 \text{ W/m}^2$) ou maintenues dans le

noir pendant 2h.

Après ce laps de temps, les bactéries ont été récupérées et filtrées selon la méthode décrite précédemment. Les membranes ont ensuite été ensemencées sur gélose et incubées à 36°C pendant 48h jusqu'à la lecture.

Les résultats sont présentés sur la figure 3.7.

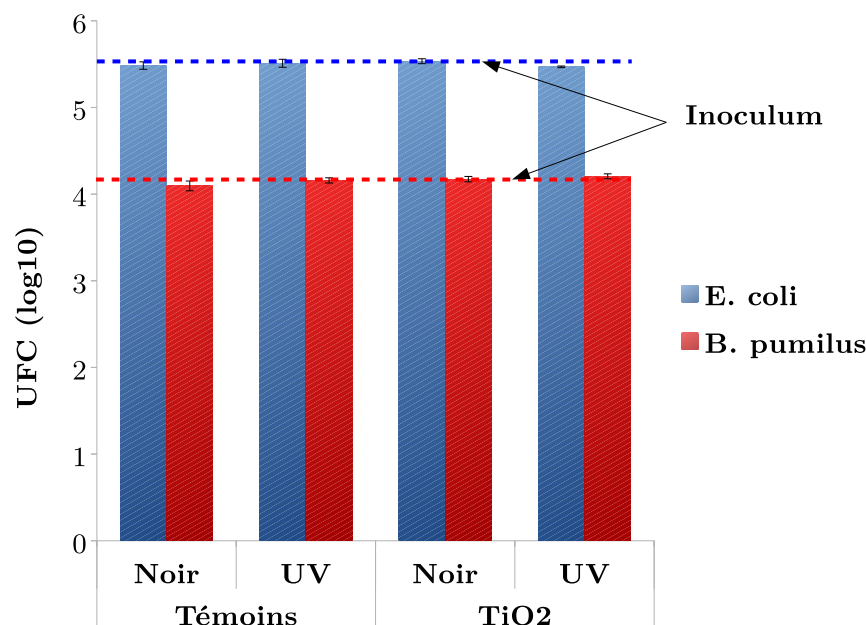


Figure 3.7 – Nombre d'UFC dénombrées au cours des premiers essais, de 2h, avec du TiO₂ déposé par sédimentation. Un test, moyenne \pm es, n=3.

Les variations du nombre d'UFC relevées entre les témoins et les échantillons avec du dioxyde de titane à 2h ou à t=0h ne varient pas de plus de 1%, traduisant une activité antibactérienne nulle.

L'objectif de cet essai est d'évaluer les propriétés des particules de TiO₂ en tant que support photocatalytique. Les méthodes d'immobilisations retrouvées dans la littérature sont généralement réalisées soit au moyen de méthodes chimiques de type sol-gel soit par une étape de calcination à des températures relativement élevées, autour de 300°C – 500°C. Aucun de ces traitements n'était adapté à notre volonté de conserver le TiO₂ et ses propriétés en l'état, c'est-à-dire, tel qu'il serait une fois incorporé dans les lasures. C'est pourquoi nous avons, pour ces essais, choisi initialement un simple dépôt par sédimentation et séchage. Sur support en verre sodo-calcique, la calcination permet de fixer le TiO₂ de manière quasi-permanente. Dans notre cas, l'immobilisation du dioxyde de titane n'était pas satisfaisante et l'ajout d'un inoculum liquide favorisait la plupart du temps le détachement et le retour en solution des particules.

Il a donc été décidé de changer de méthode d'évaluation : les particules de dioxyde de titane ont été directement introduites dans la suspension bactérienne, au dosage optimal généralement observé dans la littérature de 1 g/l. Les boîtes en borosilicate vierges ont alors été inoculées avec ce mélange test.

3.4.2 Méthode

La méthodologie développée était également basée sur la JIS. Ces essais sont décrits dans la partie 2.6.

Pour chaque essai, deux suspensions bactériennes de *E. coli* ont été préparées dans du NB au 1/500^e et dosées entre 5×10^4 et 1×10^5 . Une des suspensions a été mélangée à une solution aqueuse de TiO₂ de façon à obtenir une concentration en titane de 1 g/l dans le mélange final. Des boîtes de Petri ont été inoculées avec 400 µl du mélange final ou de la suspension bactérienne témoin et incubée en conditions de test. Les échantillons ont été récupérés à l'issue du temps t choisi.

Au total, quatre configurations ont été testées en parallèle. Elles sont représentées dans le tableau 3.1 ci-dessous. Trois échantillons ont été mis en œuvre par configuration. Pour chaque période de temps t , un essai indépendant a été lancé, dans les mêmes conditions. Les résultats présentés correspondent à l'activité antibactérienne calculée pour trois échantillons témoins et trois échantillons avec TiO₂ (JIS Z 2801, 2010).

	Irradiation UV	Obscurité
Avec TiO ₂	X	X
Sans TiO ₂	X	X

Tableau 3.1 – Tableau synthétique des quatre configurations lancées au cours de chaque test.

Une deuxième série d'essai a été réalisée dans les mêmes conditions, en plaçant délicatement un film plastique transparent sur l'inoculum, avant l'irradiation. L'ajout d'un film plastique ou d'une lamelle de microscope sur l'inoculum est proposé dans le cadre des normes JIS Z 2801 (2010) et ISO 27447 (2009) notamment pour les surfaces hydrophobes. Il s'agit dans ce cas de répartir la goutte sur une surface connue, permettant de calculer un effet antibactérien par cm² de matériau. L'état pulvérulent des particules ne permettait pas une telle répartition "surfactive". C'est pourquoi nous n'avons pas choisi d'appliquer cette méthode dans un premier temps. L'idée d'ajouter un film transparent a plutôt fait suite aux observations d'une goutte du mélange d'essai contenant des bactéries et du TiO₂, au microscope optique (Figure 3.8).

Ces clichés montrent la présence de cellules bactériennes et de particules de TiO₂ réparties sur deux plans distincts. L'ajout du film permet de réduire la distance entre les deux et augmente les probabilités de contact. Notons que ces clichés mettent également en évidence l'agglomération plus ou moins importante des particules de TiO₂ dans la goutte, ce qui constitue vraisemblablement un autre facteur limitatif de l'efficacité photocatalytique.

3.4.3 Résultats

Les activités antibactériennes sur *E. coli* de particules de TiO₂ irradiées par une lumière UV sont présentées sur la figure 3.9.

Aucune activité n'a été détectée pour les échantillons conservés dans l'obscurité en absence de film. Sans contact forcé, l'activité atteint $0,70 \pm 0,41$ log après 6h d'irradiation ($p=0,052$). Cette valeur représente une réduction d'environ 14% du nombre de bactéries sur TiO₂ par rapport au

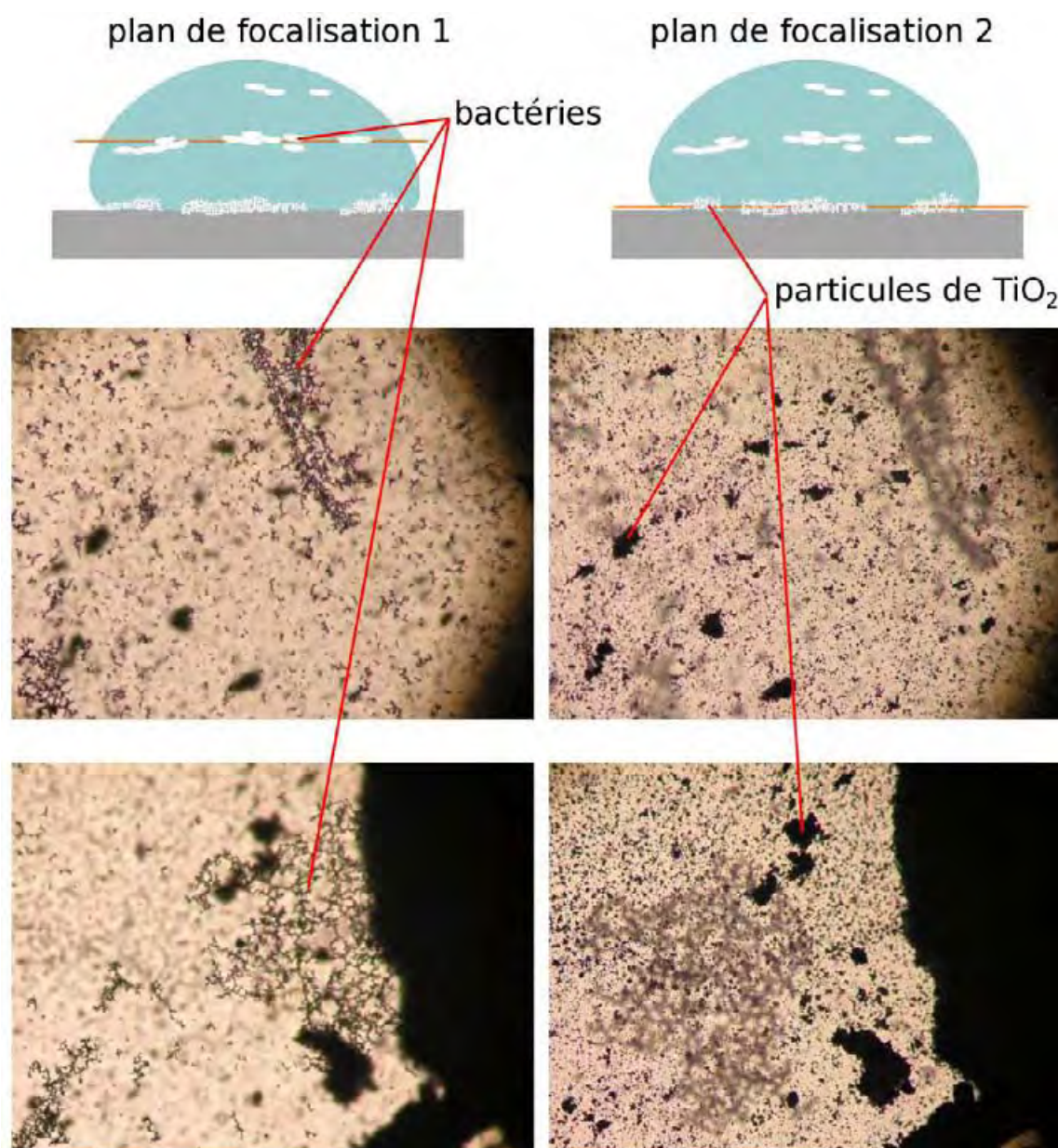


Figure 3.8 – Photographies au microscope optique ($\times 100$) d'une goutte de mélange d'essai (bactéries + TiO_2). Sur les images de gauche, on peut observer les plans sur lesquels dérivent les bactéries (plan de focalisation 1 sur le schéma). Ces plans sont différenciables, par changement de mise au point, des plans où le dioxyde de titane a sédimenté, visibles sur les photographies de droite (plan de focalisation 2).

témoin. Bien qu'une différence soit observée, selon la classification de Sayilkan *et al.* (2009), l'effet est quasiment nul (0-20% : pas d'effet bactéricide, cf partie 1.3.2).

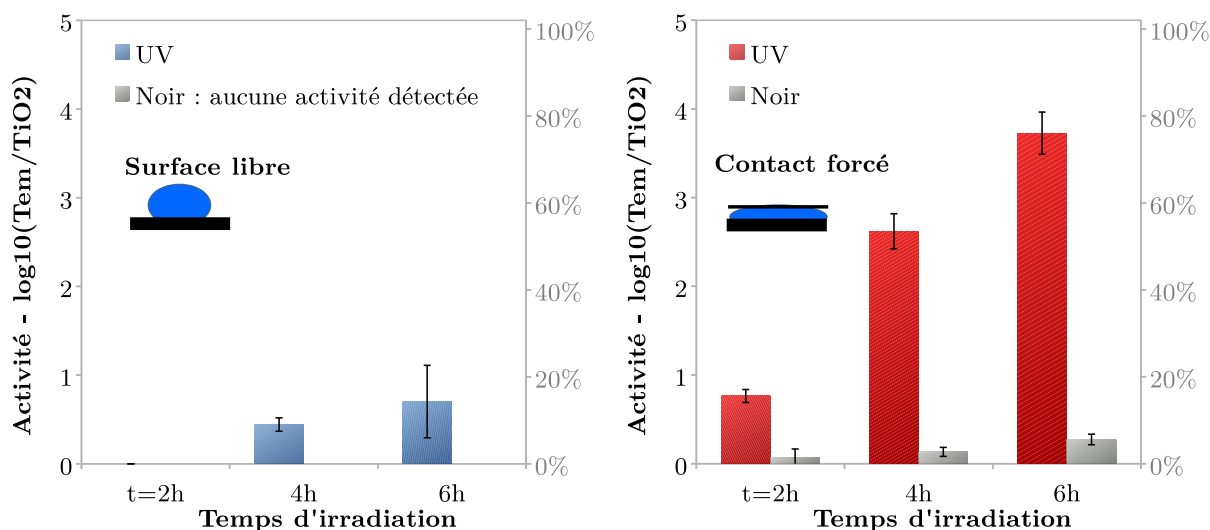


Figure 3.9 – Activité antibactérienne du TiO_2 sur *E. coli* à différents temps d'irradiation lumineuse ($2,5 \text{ W/m}^2$). A gauche, sans film ; à droite, avec un film réduisant la distance entre les bactéries et les particules. Un test indépendant réalisé par échantillon. Moyenne \pm es, $n=3$

Les résultats de la figure 3.9, à droite, montrent une augmentation significative de l'activité lorsqu'un film transparent est appliqué. On observe des activités de $0,76 \pm 0,07 \text{ log}$ ($p < 0,001$), $2,62 \pm 0,20 \text{ log}$ ($p < 0,001$) et $3,73 \pm 0,24 \text{ log}$ ($p = 0,001$) après 2h, 4h et 6h d'irradiation, respectivement. L'effet est considéré comme notoire après 4h et puissant après 6h ($> 70\%$). Une légère activité est également détectée dans le noir et semble augmenter avec le temps de contact pour atteindre $0,13 \pm 0,05 \text{ log}$ ($p = 0,018$) après 4h et $0,27 \pm 0,06 \text{ log}$ ($p = 0,001$) après 6h.

Ces résultats soutiennent l'idée que la réduction de la distance et, par conséquent, l'augmentation de probabilité de contact entre les cellules bactériennes et les particules de TiO_2 améliore le rendement de la désinfection photocatalytique. Plusieurs études ont souligné l'importance du contact bactéries-nanoparticules dans l'efficacité du processus (Gumy *et al.*, 2006, 2005; Nadtochenko *et al.*, 2006, 2008). En effet, différents phénomènes entrent en jeu au cours des réactions et, même si les conclusions sont difficiles à établir, certains auteurs convergent vers les mêmes hypothèses. L'ensemble des études montre notamment que le contact augmente les dommages oxydatifs : outre le stress induit par les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) sur des cellules bactériennes, le contact avec la surface de TiO_2 conduit à l'oxydation directe des cellules par les trous (h^+) photo-générés (Nadtochenko *et al.*, 2006, 2008). Ces réactions avec les trous à la surface du photocatalyseur participent aussi à la réduction du phénomène de recombinaison des charges (Nadtochenko *et al.*, 2006). Une autre étude, de Cho *et al.* (2005), montre que le rôle des DRO change selon le type de micro-organismes : au cours d'un essai, les radicaux dits libres, capables de diffuser loin du catalyseur, sont intervenus majoritairement sur la destruction de virus (bacteriophage MS2) alors qu'ils n'ont que très peu agi lors de l'essai sur *E. coli*. Selon Foster *et al.* (2011), le rôle des oxydants peut se résumer par le schéma de la figure 3.10. Ainsi, plus une bactérie est proche du catalyseur, plus le nombre d'agents oxydants augmente. Au

contact direct, toutes les espèces produites sont des menaces, en plus des trous photo-générés. Avec la distance à la particule, le nombre d'agents diminue (HO^\bullet et H_2O_2 puis H_2O_2 seulement) entraînant une baisse de l'efficacité.

Par ailleurs, des essais sur spores de *B. pumilus* seraient intéressants à réaliser. En effet, le peroxyde d'hydrogène est une des rares espèces à être particulièrement active vis-à-vis des formes de spores (Baldry, 1983; Von Bockelmann et von Bockelmann, 1972). Des essais avec et sans film sur les spores pourraient aider à conclure sur l'action de H_2O_2 dans le processus.

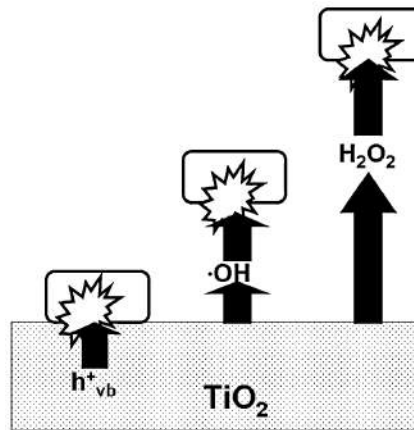


Figure 3.10 – Rôles des DRO dans la destruction photocatalytique de bactéries. L'oxydation directe des composants cellulaires peut intervenir lorsque les cellules sont en contact direct avec le catalyseur.

Les radicaux hydroxyles et H_2O_2 sont impliqués à courte et longue distances du catalyseur, respectivement (Foster *et al.*, 2011)

L'adsorption des cellules bactériennes à la surface des particules est, selon Gogniat *et al.* (2006), un point crucial et nécessaire au bon déroulement de la désinfection photocatalytique. Diverses études ont montré la diminution et/ou la perte de l'intégrité membranaire de cellules (Gogniat *et al.*, 2006) et ont mis en avant les dommages physiques induits par le contact avec le TiO_2 hautement cristallin (Caballero *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2007). Au cours d'une étude sur l'efficacité du processus photocatalytique sur des cellules cancéreuses HeLa, Cai *et al.* (1991) ont observé au MET des amas de nanoparticules présents à l'intérieur du cytoplasme (mais pas du noyau). Les auteurs suggèrent la possibilité d'un phénomène de phagocytose au cours duquel les cellules ingèrent les nanoparticules. Tous ces constats font écho aux résultats trouvés sur TiO_2 dans le noir dans notre étude, indiquant la combinaison possible d'une action chimique, par photocatalyse, et d'une action plus physique, potentiellement induite par la taille et la forme des particules, dont les mécanismes sont encore incertains. Ces résultats doivent néanmoins être interprétés avec beaucoup de précaution puisque les études de Cai *et al.* (1991) et Gurr *et al.* (2005) sont basées sur des cellules humaines, dont les processus réactionnels peuvent être totalement différents.

3.5 Influence de la nature du milieu : essai d'activité antibactérienne en suspension

L'essai en suspension a été choisi afin d'évaluer la cinétique de désinfection photocatalytique en fonction de la nature de la suspension d'essai. La mise en place de l'expérience est plus aisée

que pour les essais en boîte de Petri. En effet, ces derniers requièrent une série d'échantillons pour chaque échéance ($t=0h, 2h, 4h...$ etc). En comptant les 4 configurations nécessaires au test (avec/sans TiO_2 et avec/sans lumière) et en multipliant par le nombre d'échéance, les manipulations deviennent rapidement fastidieuses et chronophages pour les manipulations avec des boîtes de Petri. L'évaluation de la concentration bactérienne d'une suspension de plusieurs millilitres peut être réalisée avec un seul échantillon pour toutes les échéances, dans lequel sont prélevés des aliquots à intervalles réguliers.

Les essais suivants ont été menés avec deux suspensions de natures différentes et visaient à évaluer la cinétique de désinfection photocatalytique ainsi que l'influence de la composition du milieu sur les taux d'abattelements bactériens.

3.5.1 Méthodes

3.5.1.1 Validation de l'étape de neutralisation

Une étape de filtration avait initialement été choisie afin de procéder à la séparation des bactéries et des nanoparticules pour parer à des effets antibactériens résiduels potentiels. Cette étape entraîne une procédure assez lourde en terme de manipulation. Avant de commencer les essais, nous avons donc voulu vérifier la pertinence de réaliser une filtration avec ces conditions de test.

Cette vérification a été réalisée avec une suspension dosée à 1 g/l de TiO_2 et à 8×10^4 UFC/ml de cellules bactériennes. La suspension a été placée en conditions de test selon la méthode décrite dans la partie suivante. A différentes échéances, 1 ml de la suspension a été prélevé et dilué en série au 10^e . A partir de chaque dilution, 2×1 ml ont été filtrés puis ensemencés en gélose TS et, en parallèle, 2×1 ml ont été directement ensemencés. Les résultats sont présentés sur la figure 3.11.

Le graphique ne montre aucune différence entre le nombre d'UFC retrouvées sur les échantillons filtrés et le nombre d'UFC retrouvées sur les échantillons ensemencés directement. Ainsi, l'étape de filtration n'a pas été jugée nécessaire pour cette expérience. Dans ce cas, la dilution et l'inclusion en milieu gélosé lors de l'étape de dénombrement des UFC sont suffisantes pour stopper l'effet antibactérien.

3.5.1.2 Déroulement de l'essai

Les essais ont été réalisés en suspension, dans des béchers, selon la méthode décrite dans la partie 2.7 p. 91. Des essais indépendants, menés dans les mêmes conditions, ont été réalisés avec un seul échantillon. Les données présentées sont la moyenne de trois essais avec les erreurs standards correspondantes.

Afin d'évaluer l'influence de la nature de la suspension au cours de l'expérience, deux solutions ont été utilisées :

- du bouillon nutritif *NB* dilué au 500^e (cf partie 2)
- de l'eau distillée stérile.

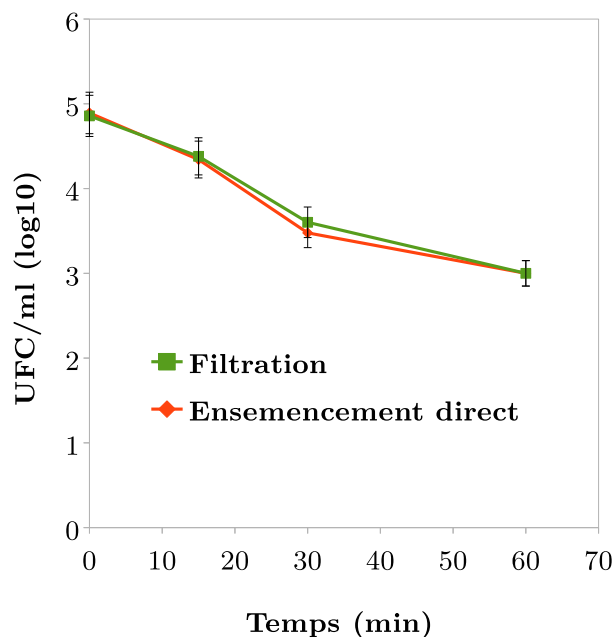


Figure 3.11 – Validation du protocole de neutralisation : les nombres d'UFC sur les échantillons filtrés et les échantillons non filtrés sont égaux.

Les conductivités des deux solutions ont été comparées en utilisant un compteur de conductivité avant l'essai. A température ambiante (21°C), les conductivités étaient 4,437 mS/m pour le bouillon et 1,1 mS/m pour l'eau distillée.

3.5.2 Résultats

La figure 3.12 présente les activités antibactériennes calculées dans les conditions de la JIS Z 2801 (hygrométrie, milieux, organismes, calculs), pour le même TiO_2 mais selon les deux méthodologies d'évaluation distinctes (goutte vs suspension). Les valeurs d'activités sont comparables, ce qui suggère que le test en boîte de Petri avec un film est semblable à l'essai en suspension sous agitation. L'agitation favorise également la probabilité de contact, comme suggéré par Daoud *et al.* (2005).

La figure 3.13 présente les résultats de l'essai d'inactivation en suspension agitée en fonction de la nature du milieu liquide. Pour les échantillons contenant du TiO_2 , les cinétiques d'inactivation sont semblables pour les expériences réalisées dans l'eau et dans le 1/500 NB. Elles comportent chacune deux étapes : une première, avec un taux d'inactivation relativement faible et une seconde, après quelques minutes, avec un taux d'inactivation bien plus important. La première étape dure environ 60 minutes dans l'eau et 120 dans le bouillon NB. Après 120 minutes, les deux courbes présentent des allures très proches.

Ces cinétiques d'inactivation semblent correspondre au modèle de Chick-Watson avec retard, basé sur l'équation empirique la plus courante pour définir les cinétiques d'inactivation (Marugán *et al.*, 2008), présentées sur la figure 3.14 et sur les équations 3.1 et 3.2 :

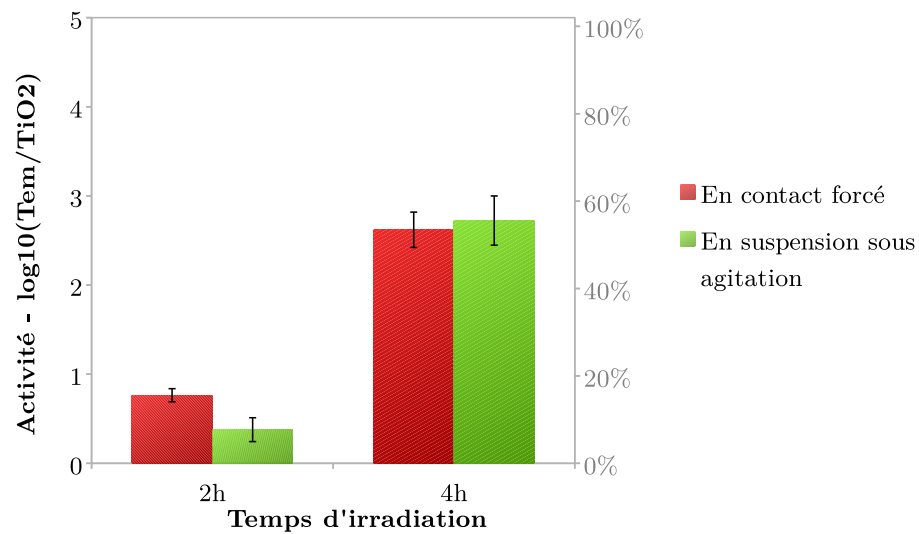


Figure 3.12 – Comparatif des activités antibactériennes entre deux méthodologies d'évaluation : En boîte de Petri VS en suspension sous agitation magnétique

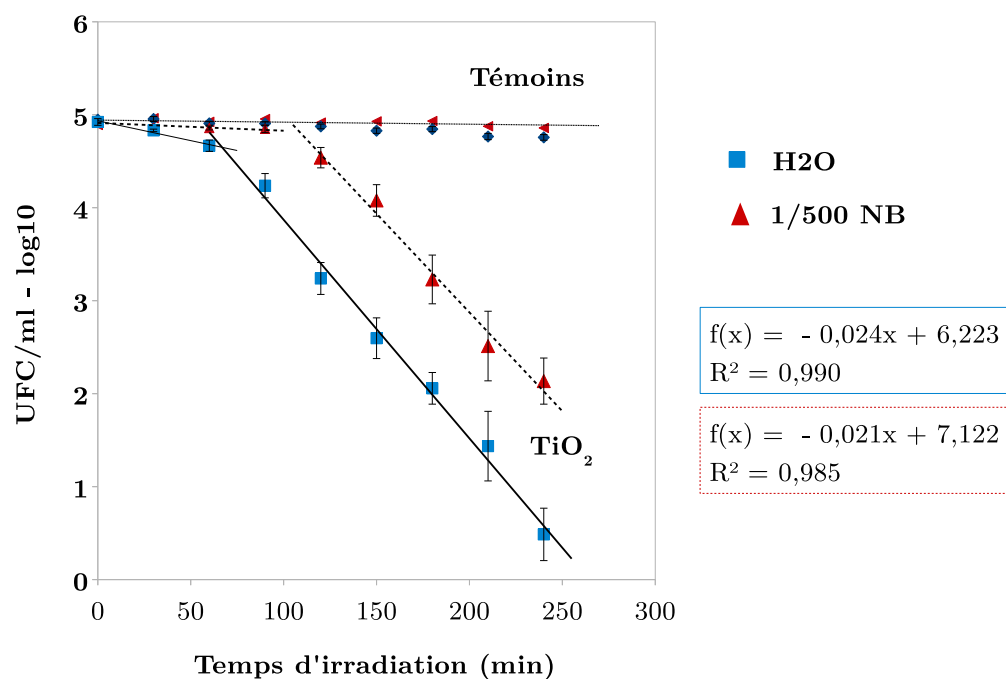


Figure 3.13 – Évolution du nombre d'UFC par ml en fonction de la nature de la suspension. Moyenne \pm es, n=3 (essais indépendants).

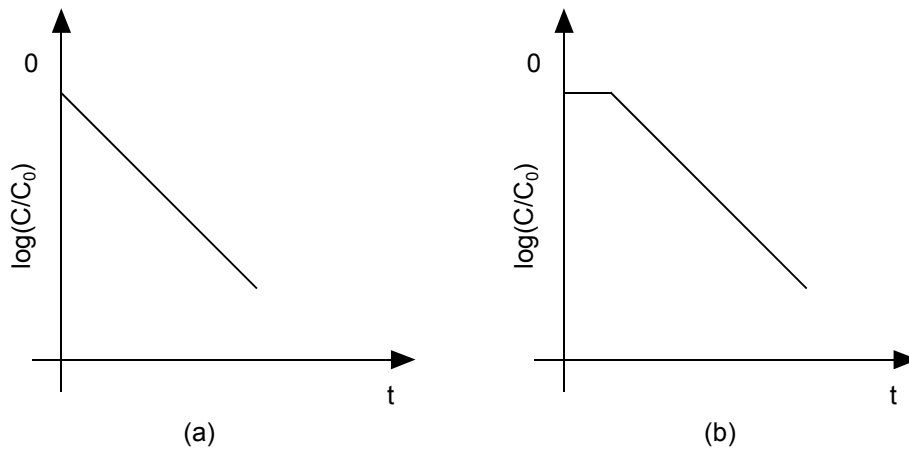


Figure 3.14 – Schéma de deux modèles cinétiques d'inactivation bactérienne : (a) Chick-Watson (3.1), (b) Chick-Watson retardé (3.2)

$$\log\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k'[c]^n t \quad (3.1)$$

$$\log\left(\frac{C}{C_0}\right) = \begin{cases} 0 & \text{si } t \leq t_0 \\ -k'(t - t_0) & \text{si } t \geq t_0 \end{cases} \quad (3.2)$$

Avec C , la concentration bactérienne à l'instant t ; C_0 , la concentration bactérienne initiale; k' la constante cinétique d'inactivation; c , la concentration de l'agent désinfectant; n , l'ordre de la réaction; t_0 , le temps de retard. Dans notre cas, la concentration en TiO_2 ne varie pas pendant la réaction, ainsi le terme $[c]^n$ est égal à 1.

Dans notre essai, les taux d'inactivation, correspondants à la constante cinétique d'inactivation k' , sont très proches pour les deux milieux, avec des valeurs de $0,024 \text{ min}^{-1}$ dans l'eau et $0,021 \text{ min}^{-1}$ dans le bouillon NB.

Selon certains auteurs, le faible taux d'inactivation de la première étape peut être dû à la phase préliminaire de l'attaque des DRO sur la paroi externe des cellules (Dunlop *et al.*, 2001; Sunada *et al.*, 2003). Au cours de cette première étape, les dommages subis peuvent être insuffisants pour tuer les bactéries : à ce stade de dégradation, les cellules sont encore capables de récupérer et croître à nouveau, une fois en présence d'un milieu riche de type gélose TS. Après un certain temps, la dégradation de la membrane externe permet aux espèces réactives de pénétrer plus en avant et d'induire des dommages conduisant à la mort des cellules bactériennes (deuxième phase des courbes de la figure 3.13). Cette hypothèse a également été considérée par d'autres chercheurs (Benabbou *et al.*, 2007; Mitoraj *et al.*, 2007) qui expliquent notamment cette période dormante comme le temps pour la concentration de DRO photo-générés d'augmenter à un niveau préjudiciable à l'activité des cellules bactériennes.

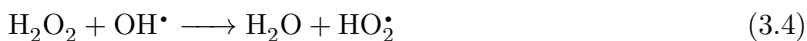
Une autre explication possible pour cette première étape avec un faible taux d'inactivation a été proposée par Gogniat *et al.* (2006). Dans leurs travaux, ils ont observé une courbe avec deux cinétiques d'inactivation uniquement lorsque les essais étaient réalisés dans une solution de

phosphate de sodium. Les courbes d'essais réalisés dans une solution de NaCl-KCl présentaient une seule cinétique d'inactivation, semblable au premier modèle de Chick-Watson. Selon Gogniat *et al.* (2006), la phase d'adsorption sur les particules de TiO_2 est une étape nécessaire au processus de désinfection photocatalytique. Les auteurs indiquent que, dans la solution de phosphate de sodium, l'adsorption des ions sur le TiO_2 débute dès l'introduction des nanoparticules, même dans le noir. Dès le début de l'expérience, le changement des propriétés d'adsorption du TiO_2 engendré par l'irradiation lumineuse conduit à une perte d'affinité avec le phosphate et à une photo-désorption des ions, permettant aux bactéries d'y adhérer. Ainsi, le temps nécessaire au processus de photo-désorption des ions expliquerait la phase dormante de l'inactivation observée dans les premières minutes de l'expérience. Ces phénomènes de photo-adsorption et photo-désorption sont évidemment dépendants de la composition de la suspension et de la durée d'irradiation du catalyseur.

Certains travaux ont fait état d'une étape finale dans les courbes d'inactivation, constituée par une forte atténuation du processus (Benabbou *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009; Muranyi *et al.*, 2010). Plusieurs hypothèses ont été proposées par Rincón et Pulgarin (2005) comme effets de cette atténuation :

1. La compétition d'accès au photocatalyseur et aux radicaux entre les bactéries survivantes, les mortes et les sous-produits générés par la lyse bactérienne
2. La diminution de la probabilité de contact des agents oxydants avec les bactéries (due au nombre décroissant de bactéries survivantes)
3. L'arrivée du système à un état tel que l'inactivation photocatalytique est contrebalancée par la croissance bactérienne

Une autre hypothèse a également été proposée par Benabbou *et al.* (2007) impliquant des réactions terminales, visibles dans les équations 3.3 et 3.4, pour des concentrations élevées en TiO_2 . Les radicaux hydroxyles se recombineraient facilement pour former du peroxyde d'hydrogène selon l'équation 3.3. L'interaction de H_2O_2 avec de nouveaux HO^\bullet entraînerait la production d'hydroperoxyde, selon l'équation 3.4, beaucoup moins réactif, qui ne participerait pas au processus photocatalytique (Legrini *et al.*, 1993).



Cette atténuation n'a pas été détectée au cours de l'expérience dans l'eau distillée, avec une réduction logarithmique de valeur constante jusqu'à la limite de détection. Il est raisonnable de supposer l'émergence ou la combinaison des phénomènes suivants pour ces essais : (a) la concentration en TiO_2 était suffisamment faible pour ne pas entraîner d'auto-réaction entre les radicaux hydroxyles, et (b) les bactéries ne sont pas dans des conditions de croissance suffisantes pour contrebalancer la désinfection. La diminution de la probabilité de contact avec les bactéries et la compétition d'accès au photocatalyseur ne semblent pas avoir eu d'effet en fin de réaction. Ces hypothèses sont valables pour l'essai réalisé dans l'eau distillée mais pas pour celui réalisé dans le milieu 1/500 NB. En effet, 2 logarithmes de bactéries sont encore détectées après 6h de

contact. L'expérience n'a pas été conduite sur une période suffisamment longue pour affirmer qu'il n'y ait aucune atténuation en fin de processus.

La figure 3.13 renseigne également sur les différences d'inactivation selon la nature de la solution utilisée dans l'expérience. La deuxième phase d'inactivation (cinétique élevée) commence plus tard dans le milieu 1/500NB même si les coefficients d'inactivation sont semblables ($0,0212 \text{ min}^{-1}$ et $-0,0235 \text{ min}^{-1}$). Il semble que le bouillon 1/500NB agisse comme un agent retardateur (neutralisant), en augmentant la phase stationnaire sans changer la cinétique de la deuxième phase. Ces résultats semblent en accord avec l'effet inhibiteur des ions et des composés organiques sur la désinfection photocatalytique rapporté par la littérature (Dunlop *et al.*, 2001; Rincón et Pulgarin, 2004; Saito *et al.*, 1992). Des chercheurs ont exposé l'effet retardateur de certains anions, Cl^- notamment, sur le taux d'oxydation, en réagissant avec les trous (h^+) du catalyseur par exemple (Abdullah *et al.*, 1990). Concernant les anions, il a été montré des effets bénéfiques ou néfastes, dépendamment de leur nature et de leur concentration dans la solution (Carp *et al.*, 2004).

De manière générale, différents mécanismes ont été mis en avant pour expliciter l'impact des ions et des composés organiques présents dans la solution sur la photocatalyse ; qu'ils agissent sur le processus en lui-même ou sur les réactions de désinfection :

1. La compétition d'accès au photocatalyseur entre toutes les espèces, accaparant les sites actifs (trous et électrons) à sa surface
2. La mobilisation des radicaux par les espèces étrangères,
3. La génération d'un effet barrière, filtrant les UV, par des agrégats organiques ou des sous-produits de la photocatalyse.

Ces mécanismes peuvent intervenir et perturber l'efficacité de la photocatalyse pour n'importe quel corps organique étranger présent dans la suspension aqueuse. Cela explique notamment les baisses d'efficacité observées avec des concentrations bactériennes plus élevées, mentionnées dans le chapitre 1. En outre, il est essentiel de rappeler que ces effets ont un impact qui se limite simplement à un retard dans le processus de traitement pour nos conditions d'essai. En effet, puisque le photocatalyseur n'est pas consommé pendant la réaction, la désinfection complète d'une suspension aqueuse, c'est-à-dire l'élimination de la totalité des cellules bactériennes ne devrait être qu'une question de temps. En revanche, ces mécanismes peuvent devenir de véritables facteurs limitants pour des essais dynamiques, où l'apport de matière à dépolluer et de matière organique perturbatrice serait continu.

Certains auteurs ont comparé les efficacités entre du TiO_2 dispersé et immobilisé (Gomes *et al.*, 2009; van Grieken *et al.*, 2009). Pablos *et al.* (2011) ont observé un taux d'inactivation plus élevé en début de réaction avec du dioxyde de titane immobilisé. Ils suggèrent que les dommages ont été uniformément répartis sur l'intégralité des parois cellulaires lors de l'essai en suspension, alors qu'ils ont été plutôt concentrés sur de petites zones avec le TiO_2 immobilisé, nécessitant de petites quantités de radicaux pour obtenir une inactivation détectable. Toujours est-il que les temps d'inactivation totaux de cellules de *E. coli* étaient semblables pour les deux types de test (en suspension et immobilisé).

D'autre part, Gumy *et al.* (2005) ont observé une meilleure efficacité d'inactivation du TiO_2 en suspension qu'avec des supports commerciaux de chez Ahlstrom recouverts de TiO_2 . Ils suggèrent que les particules dispersées dans la suspension fournissent plus de surface pour l'adsorption des bactéries. Les mêmes observations ont été rapportées par Gomes *et al.* (2009) avec des supports Ahlstrom. Selon les auteurs, ces résultats pourraient également être expliqués par des réactions avec la matière organique relarguée par le support pendant l'expérience. En conséquence, la présence d'ions et/ou de composés organiques dans le milieu de réaction (suspension ou goutte) peut réduire considérablement les rendements théoriques, en réagissant avec d'autres espèces oxydantes à la place des cellules bactériennes (Gogniat *et al.*, 2006; Rincón et Pulgarin, 2004).

L'ensemble de ces travaux laisse penser que les revêtements de TiO_2 formulés avec un liant contenant des composés organiques pourraient monopoliser les radicaux photo-générés et, par conséquent, conduire à une diminution de l'efficacité de ces produits. Cette problématique sera abordée dans le chapitre 4.

3.6 Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif d'évaluer l'efficacité de particules photocatalytiques seules sur l'activité bactérienne et d'explorer l'influence de certains paramètres méthodologiques et expérimentaux sur cette efficacité. Il s'agissait d'une étude préalable indispensable au développement de lasures photocatalytiques incluant des particules de TiO_2 au sein d'une matrice liante. La connaissance de ces facteurs et de leur impact sur l'efficacité de la photocatalyse est une étape nécessaire pour l'appréhension et la prévision des éventuels mécanismes limitants qui peuvent survenir avec de tels produits.

La première partie a exploré l'action de différents types de particules sur des cellules bactériennes dans le noir, pendant un contact prolongé et sans activité photocatalytique. À partir des résultats et de l'analyse de la littérature, deux modes d'action sont envisagés : physique, de par la taille, la forme et la structure cristalline des particules, et chimique par la production d'espèces oxydantes, même dans le noir. Ces deux mécanismes peuvent contribuer à une action inhibitrice de croissance voire une combinaison d'actions inhibitrice de croissance et bactéricide.

La deuxième partie de ce chapitre a permis de mettre en avant l'importance du contact et de la distance qui sépare les particules et les bactéries sur l'efficacité de la désinfection. L'application d'un film transparent sur l'inoculum a permis d'augmenter la probabilité du contact entre les particules et les cellules qui se présentaient sur des plans distincts au sein d'une même goutte, contribuant ainsi à l'amélioration notable de l'efficacité du traitement. Le rôle des espèces oxydantes proches du catalyseur (h^+ , HO^\bullet , H_2O_2) sur l'efficacité de la désinfection est mis en avant.

Finalement, l'incidence de la nature de la suspension a été évaluée dans la dernière partie. Une différence significative dans les taux d'abattement a été observée au cours d'essais réalisés dans deux solutions différentes, de l'eau et un milieu NB. La présence d'éléments interférents

dans le milieu de réaction vient perturber l'efficacité de la photocatalyse et peut devenir une entrave sérieuse à la désinfection en essai dynamique ou en situation réelle.

L'ensemble de ces paramètres, qui régissent l'activité du TiO_2 seul, doit être pris en compte et peut être à l'origine de différentes problématiques lorsque des particules sont incorporées dans une matrice liante. Les problématiques de formulation et d'efficacité de tels produits sont évoquées dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Développement et évaluation de l'efficacité et des modes d'action de revêtements antimicrobiens

Sommaire

4.1	Introduction	128
4.2	Lasures photocatalytiques	129
4.2.1	Étude du caractère superhydrophile photo-induit	129
4.2.1.1	Surfaces testées	130
4.2.1.2	Résultats	131
4.2.2	Évaluation de l'activité anti-bactérienne	135
4.2.2.1	Préparation de supports	135
4.2.2.2	Procédure expérimentale	136
4.2.2.3	Activité de la lasure photocatalytique contenant des silicates	137
4.2.2.4	Activité des premières lasures photocatalytiques sans silicates	138
4.2.2.5	Lasure formulée à base de titane en dispersion chimique	140
4.2.3	Évaluation de la formation de biofilm sur revêtement photocatalytique	145
4.2.3.1	Méthodes	145
4.2.3.2	Résultats d'essais	145
4.2.3.3	Évaluation qualitative de la formation de biofilm	147
4.2.4	Synthèse des résultats sur lasure photocatalytique	151
4.3	Produits bio-sourcés à base d'esters de glycérol	155
4.3.1	Propriétés antibactériennes	156
4.3.1.1	Évaluation de l'efficacité bactéricide selon la norme NF EN 1040	156
4.3.1.2	Activité antibactérienne selon la norme JIS	157
4.3.2	Prolifération par contamination "naturelle"	159
4.4	Conclusion	161

4.1 Introduction

La dégradation de la qualité de l'air intérieur est une problématique qui suscite un intérêt grandissant dans le monde entier. La prolifération microbienne dans l'environnement intérieur constitue un des principaux polluants reconnus et contribue notamment au Syndrome du Bâtiment Malsain. Les micro-organismes sont à l'origine du relargage de spores, d'allergènes, de toxines et de COV pouvant être très dangereux pour la santé des usagers. Un certain nombre d'études a déjà souligné que les matériaux de construction pouvaient devenir des sites de prolifération microbienne majeurs une fois contaminés. Les conditions favorables à cette croissance microbienne sont facilement satisfaites dans les environnements humides comme les bâtiments anciens, mal isolés ou ayant subi des dégâts des eaux.

Le principal objectif de ce chapitre est de développer et d'étudier l'efficacité de revêtements antimicrobiens pour matériaux de construction. Nous nous sommes d'abord intéressés, dans la continuité du travail présenté dans le chapitre 3, à des revêtements de type lasure contenant des particules de dioxyde de titane photocatalytiques. L'intérêt des lasures réside dans le fait que (i) ce type de produit est facile à mettre en oeuvre sur matériaux de construction, (ii) il peut être appliqué sur matériaux neufs comme en rénovation, (iii) les lasures sont des produits semi-transparents qui permettent de conserver l'aspect brut du matériau ou bien le masquer si un pigment est ajouté. Nous avons par ailleurs souhaité étudier une solution antimicrobienne alternative consistant en un produit bio-sourcé à base d'ester de glycérol. Ce type de produit a notamment montré des propriétés spécifiques vis-à-vis de l'eau, notamment hygroscopique et tensioactive, et une bonne stabilité chimique lorsqu'il est appliqué sur du béton frais. La littérature suggère par ailleurs des propriétés antimicrobiennes pour ce type de molécule. Nous avons souhaité explorer ces propriétés dans la perspective d'initier le développement de revêtements bio-sourcés multifonctionnels.

La première partie de ce chapitre concerne donc les lasures photocatalytiques dont les formulations ont été présentées au chapitre 2. Différentes lasures ont été testées. La première a été formulée avec un liant inorganique constitué de silicates, dans le but d'explorer un liant insensible à la photocatalyse. Par la suite, d'autres lasures ont été formulées sans silicates, avec un liant organique à base d'acrylique, et des particules de TiO_2 sous forme pulvérulente. Finalement, la dernière lasure a été réalisée avec le même liant organique et en utilisant une dispersion chimique de TiO_2 commerciale.

Les objectifs de cette partie sont, en utilisant un panel de techniques microbiologiques préalablement adaptées à la problématique de l'étude, de (i) quantifier les propriétés antimicrobiennes des lasures en relation avec certaines propriétés de surface, et (ii) contribuer à la compréhension des mécanismes d'action de la photocatalyse sur les micro-organismes.

Cette partie décrit tout d'abord certaines propriétés physiques et de surface des lasures. Dans un deuxième temps, l'activité antibactérienne des lasures est évaluée, en se basant sur les normes JIS Z 2801 (2010) et ISO 27447 (2009). Ce chapitre explore notamment l'influence de la formulation et du pré-vieillessement par une exposition à la lumière UV sur l'activité antibactérienne.

La partie suivante porte sur l'évaluation de la résistance à la prolifération bactérienne sous forme de biofilms. Une campagne d'investigations a été menée sur la lasure en couplant deux méthodes complémentaires d'analyse : une approche quantitative, par dénombrement des UFC et une approche qualitative, par observation au microscope à épifluorescence.

Finalement, la quatrième et dernière partie est un travail exploratoire sur des molécules biosourcées de la famille des esters de glycérol, dont les propriétés antimicrobiennes ont déjà été soulignées. L'objectif est ici de mener une série d'essais préliminaires afin de cibler la gamme d'efficacité du produit et d'observer ses caractéristiques en tant que revêtement pour matériaux de construction. Trois essais ont été menés : la mesure du potentiel bactéricide (essais de bactéricidie, (NF EN 1040, 2006)), la mesure de l'activité antibactérienne (JIS Z 2801, 2010), et enfin, la résistance à la prolifération sur matériaux de construction par inoculation naturelle.

4.2 Lasures photocatalytiques

4.2.1 Étude du caractère superhydrophile photo-induit

Le dioxyde de titane photocatalytique présente un caractère superhydrophile photo-induit (Fujishima *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003) : une fois irradié par une source de lumière UV, l'angle de contact d'une goutte d'eau sur la surface tend vers zéro. L'eau s'étale sur le support et forme un film très mince à la surface du matériau.

Les processus à l'origine du caractère super-hydrophile des surfaces de TiO_2 photocatalytique sont différents de ceux de la photocatalyse mais peuvent survenir en parallèle (Fujishima *et al.*, 2000). Les électrons et les trous photo-générés réduisent les anions Ti(IV) en cations Ti(III) et oxydent les anions $\text{O}(-\text{III})$ respectivement. L'éjection des anions oxygène entraîne la création de lacunes vers lesquelles les molécules d'eau peuvent se déplacer et créer des groupements hydroxyles adsorbés en surface. Ces propriétés confèrent ainsi aux matériaux utilisant du dioxyde de titane un caractère autonettoyant intéressant pour divers types d'application (verre, matériaux de construction...) : l'angle de contact d'une goutte d'eau sur une surface superhydrophile diminue jusqu'à des valeurs proches de zéro. L'eau à la surface est sous forme d'un film fin qui s'étale et s'écoule sous l'effet d'une légère inclinaison de la surface, emportant avec lui les salissures non adhérentes au support. Plusieurs études ont déjà fait état du caractère superhydrophile de ciments photocatalytiques (Diamanti *et al.*, 2008) ou de films de TiO_2 (Yu *et al.*, 2003) une fois irradiés par une source d'UV. L'étude de Yu *et al.* (2003) montre que, même après une conservation dans le noir pendant plusieurs semaines, les supports avec des angles initialement autour de $50^\circ - 60^\circ$ retrouvent des angles de contact avec l'eau inférieur à 10° , après seulement quelques heures d'exposition.

Le caractère hydrophile ou hydrophobe a une importance fondamentale dans les phénomènes d'adhésion des micro-organismes aux substrats (Busscher et Weerkamp, 1987; Fletcher et Loeb, 1979; Katsikogianni et Missirlis, 2004). L'adhésion est la première étape de la formation de biofilms qui permet la prolifération microbienne secondaire sous forme sessile. De nombreux facteurs physico-chimiques, électrostatiques et thermodynamiques entrent en jeu dans les interactions des micro-organismes avec un support (Allion, 2004; Busscher *et al.*, 1984; Chavant *et al.*, 2002).

Dans leur travaux, Fletcher et Loeb (1979) ont évalué le nombre de bactéries adhérentes sur différents types de support. Une concentration élevée en bactéries a été retrouvée sur les matériaux hydrophobes de type plastiques (téflon polyéthylène...), très peu chargés électriquement, tandis que des matériaux hydrophiles (verre, mica, plastics oxydés), chargés plutôt négativement, ne présentaient qu'une petite quantité de bactéries adhérentes. Les travaux de Faille *et al.* (2002) ont montré des résultats similaires. Pour mémoire, l'état de l'art de Katsikogianni et Missirlis (2004), présenté dans le chapitre 1, souligne les facteurs déterminants de l'adhésion microbienne, notamment les caractéristiques surfaciques du matériau support :

- la composition chimique,
- la charge surfacique,
- l'hydrophobicité
- la configuration physique de surface (porosité et rugosité)

Notons que, dans le cadre des matériaux de construction (matériaux poreux), des études traitant de la colonisation de matériaux par des algues ont montré que l'application d'un revêtement hydrofuge sur la surface des matériaux permettait de retarder la colonisation (Martinez *et al.*, 2014). En effet, l'application de l'hydrofuge confère à la surface une certaine hydrophobicité, qui contribue à la réduction d'absorption d'eau par capillarité. L'effet protecteur du revêtement est induit indirectement, par réduction de l'eau disponible (a_w) en surface pour le développement des micro-organismes.

D'autres études ont indiqué que ces traitements hydrofuges n'étaient pas durables dans le temps et demandaient d'être entretenus régulièrement, ou combinés à des biocides afin d'offrir une protection pérenne pour les matériaux (Moreau *et al.*, 2008; Nugari et Pietrini, 1997; Urzi et Leo, 2007).

Dans le contexte de cette thèse, les informations relatives au caractère superhydrophile des lasures formulées permettraient d'envisager leur utilisation pour empêcher l'adhésion de micro-organismes et contribuer à la prévention de la formation de biofilms, en plus du caractère désinfectant prodigué par la photocatalyse. Des mesures d'angle de contact ont donc été réalisées sur les lasures recouvrant différents types de support, après plusieurs temps de pré-vieillessement par une irradiation à la lumière UV.

4.2.1.1 Surfaces testées

Les deux lasures étudiées dans cette partie ont été décrites dans le chapitre 2. Il s'agit de :

- la lasure LP_{dis}, formulée avec 93% d'eau, 5% de dispersion de TiO₂ et 2% d'acrylique,
- une lasure témoin, formulée à partir de 98% d'eau et 2% d'acrylique.

Les mesures d'angle de contact ont été réalisées sur différents matériaux recouverts des deux lasures.

Les premières mesures concernent des membranes en polycarbonate et des pâtes de ciment comme support. Les échantillons ont été recouverts avec 0,5 ml de lasure au moyen d'une micropipette et stockés à l'air ambiant pour séchage pendant plusieurs heures. Contrairement aux pâtes de ciment, les membranes, caractérisées par une porosité entre 5% et 20%, avec des pores

de diamètre $0,4\ \mu\text{m}$ (données fournisseur), ont été déposées sur des boîtes de Petri en plastique, et ont été considérées comme des supports non-absorbants.

La deuxième série a été effectuée sur des matériaux de construction de type mortier, plaques de placoplâtre et plâtre, d'environ $5 \times 10\ \text{cm}^2$, qui ont été enduits de lasure photocatalytique ou de lasure témoin à l'aide d'un pinceau.

4.2.1.2 Résultats

La figure 4.1 présente les résultats obtenus à partir des mesures d'angles de contact de gouttes d'eau sur LP_{dis} et sur la lasure témoin (non photocatalytique) appliquées sur 2 matériaux supports (pâte de ciment et membrane en polycarbonate) en fonction du temps de pré-vieillessement (exposition à une lumière UV positionnée pour générer une irradiance de $5\ \text{W}/\text{m}^2$ au niveau de la surface traitée) en conditions ambiantes (cf figure 2.18, p. 101).

La figure 4.2 montre l'évolution de la morphologie des gouttes après différents temps de pré-vieillessement des lasures sous UV.

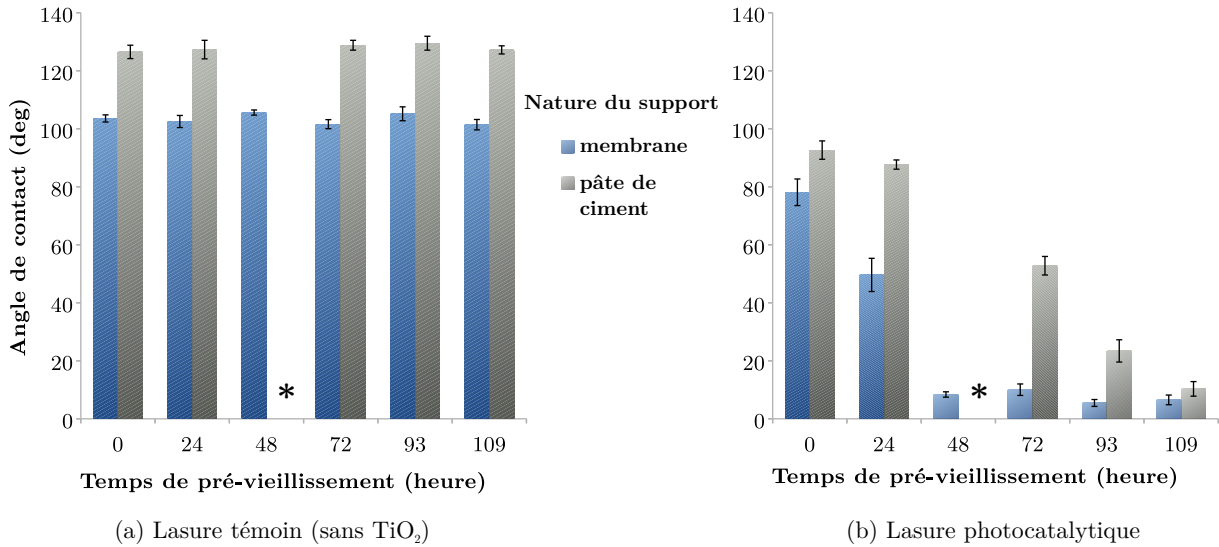


Figure 4.1 – Évolution de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur des échantillons revêtus de lasure photocatalytique et de lasure témoin, en fonction du temps de pré-vieillessement à la lumière UV.

Moyenne \pm es, $6 < n < 12$. * : pas de mesure possible pour la pâte de ciment à 48h.

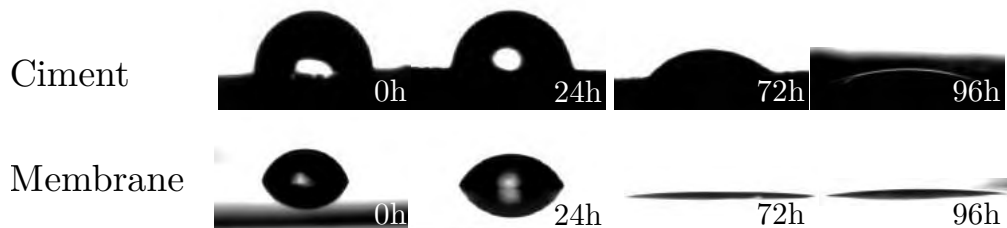


Figure 4.2 – Clichés de l'évolution de la forme d'une goutte quelques secondes après le dépôt pour différents temps de pré-vieillessement.

Pour les deux matériaux, la lasure témoin non photocatalytique montre des angles de contact autour de 103° et 128° , sur la membrane et la pâte de ciment respectivement. Les angles n'évo-luent pas de plus de 3% autour de la moyenne quel que soit le temps d'exposition préalable à une lumière UV (jusqu'à des temps de pré-vieillessement de 109h).

Concernant les lasures photocatalytiques (LP_{dis}), les angles de contact étaient initialement d'environ 78° et 93° sur la membrane et sur la pâte de ciment, respectivement. Les angles sur la membrane diminuent sensiblement lorsque le temps préalable d'irradiation UV de la lasure passe de 0h à 24h puis à 48h. L'angle de contact sur membrane est d'environ 10° avec un pré-vieillessement de 48h (contre 78° sur la membrane non pré-vieille). Les mesures se stabilisent ensuite autour de 10° , même après 109h.

En revanche, la diminution observée pour les échantillons de pâte de ciment est beaucoup plus progressive, de 93° à 10° après 109h d'exposition aux UV.

Ces résultats montrent tout d'abord que sans irradiation lumineuse (à $t=0h$), la lasure contenant des particules de TiO_2 confère aux matériaux des angles de contact légèrement plus faibles que la lasure sans particules. Ensuite, les résultats mettent bien en évidence le caractère super-hydrophile de la lasure photocatalytique irradiées sous UV mais la diminution de l'angle de contact avec le temps de pré-vieillessement est toutefois moins marquée dans le cas du support cimentaire.

Les différences observées dans les cinétiques de diminution entre les deux matériaux pourraient notamment s'expliquer par la différence radicale entre leur surface. En effet, il est possible que la formation d'un film de lasure régulier et totalement homogène ait été empêché par la rugosité élevée et la porosité ouverte en surface des échantillons de pâte de ciment. Cette hypothèse semble être confirmée par la série d'observations réalisée au MEB, présentées sur la figure 4.3.

Les observations de la membrane montrent un état de surface qui semble bien homogène, lisse et sans pores visibles au grossissement utilisé. En revanche, de nombreuses fissures et pores sont observables sur l'ensemble de la surface des échantillons de ciment (Figure 4.4). La présence de nombreux trous atteste de la répartition non homogène de la lasure et est probablement à l'origine des différences dans le caractère super-hydrophile de la pâte de ciment par rapport à celui de la membrane.

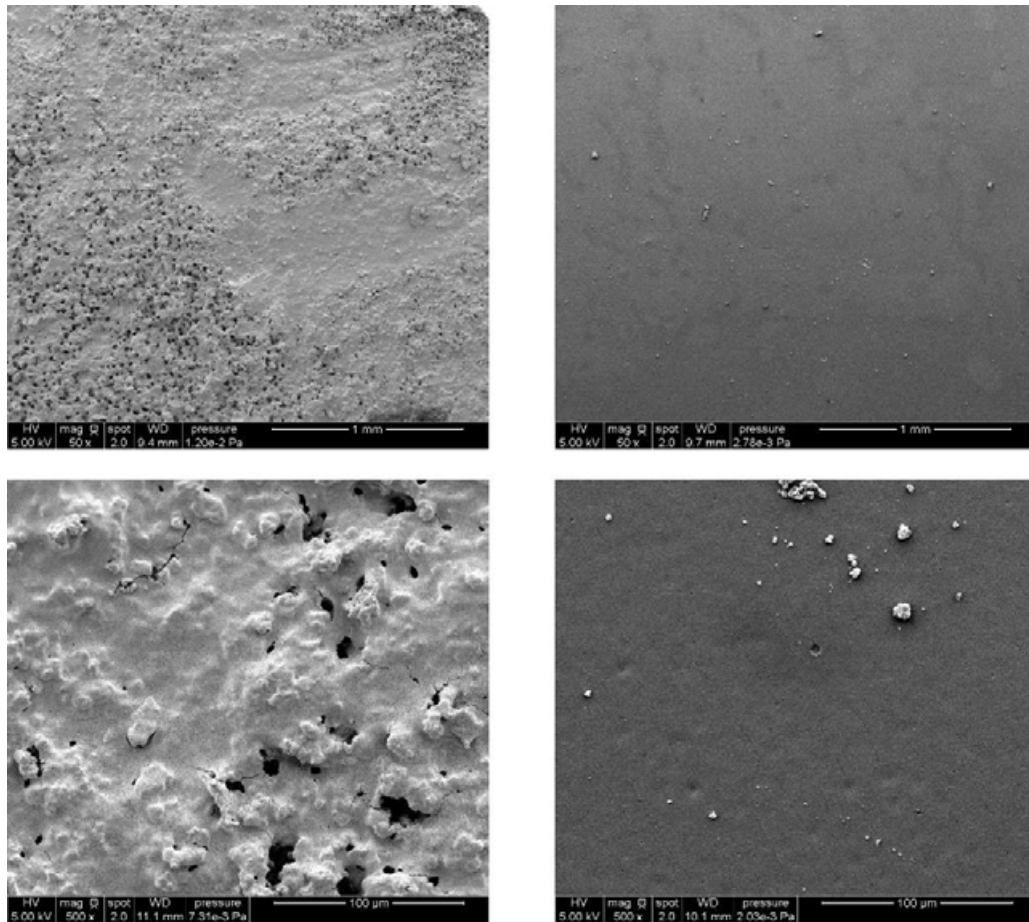


Figure 4.3 – Clichés MEB des échantillons de pâte de ciment (à gauche) et de membrane (à droite) recouverts de LP_{dis} . Grossissement x50 et x500 de haut en bas.

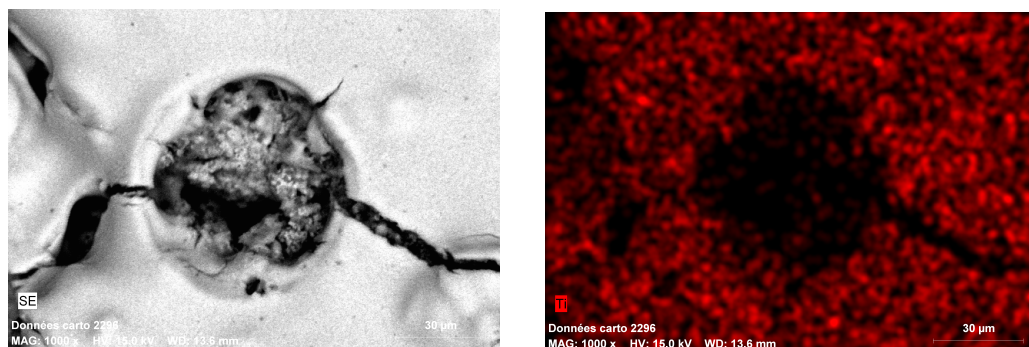


Figure 4.4 – Cliché MEB en mode électrons secondaires des échantillons de pâte de ciment et cartographie EDX du titane

Des mesures ont également été réalisées sur 3 autres matériaux, incluant du mortier, du placo et du plâtre. Comme les échantillons ont été recouverts à l'aide d'un pinceau, les quantités surfaciques de TiO_2 n'ont pas pu être estimées. Les résultats sont présentés sur la figure 4.5.

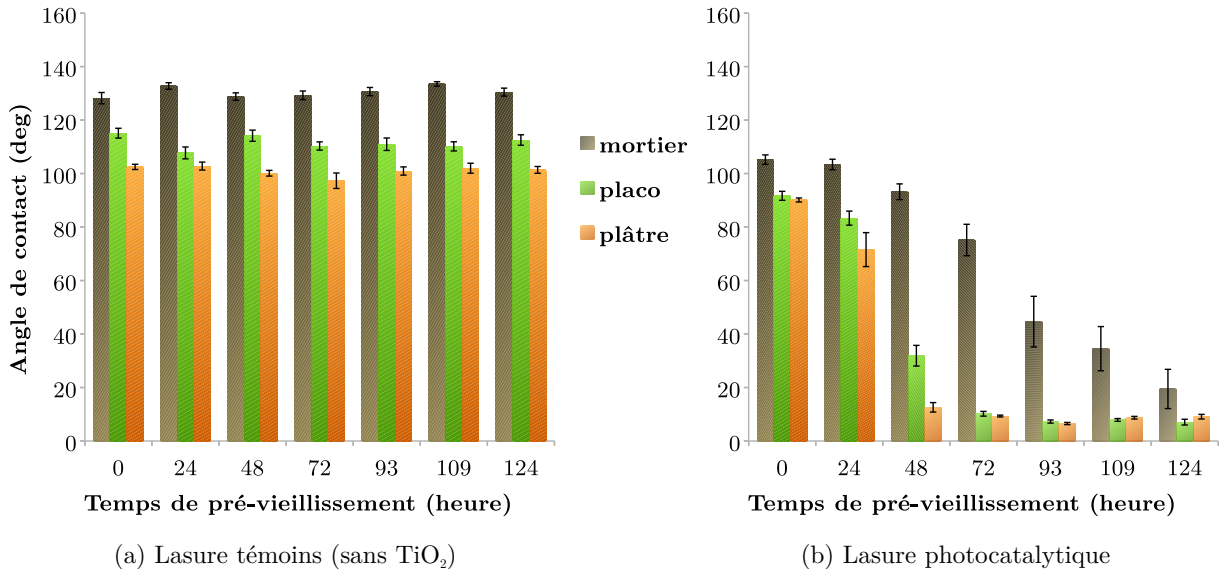


Figure 4.5 – Évolution de l'angle de contact sur différents matériaux recouverts de lasure photocatalytique et recouverts de lasure témoins, sans titane, en fonction du temps de pré-vieillessement à la lumière UV. Moyenne \pm es, $6 < n < 12$

L'évolution des angles de contact pour le placoplâtre et le plâtre en fonction des temps de pré-vieillessement est semblable à celle observée sur membrane. Elle présente une diminution de l'angle assez rapide, de 92° à 10° pour le placo et de 90° à 9° pour le plâtre après 72 heures de pré-vieillessement. Sur mortier, la diminution est moins marquée, semblable à la celle observée sur pâte de ciment. La diminution des angles de contact de 105° à environ 10° a été observée sur les échantillons après 148 h de pré-vieillessement. Cependant, les mesures présentées sur la Figure 4.5 sont une moyenne de plusieurs gouttes réparties sur l'ensemble de la surface des échantillons. Les mesures sur mortier ont montré une grande hétérogénéité sur la surface.

Sur la figure 4.6, on peut observer deux morphologies de goutte complètement différentes, affichant des caractères hydrophobe pour l'une et hydrophile pour l'autre. Ces photos ont été réalisées sur deux gouttes, en deux points du même échantillon après 109h d'exposition. Des observations au MEB en mode électrons rétrodiffusés (Figure 4.7), couplés à une analyse EDS, ont permis de mettre en évidence la répartition hétérogène, retrouvée dans les différences d'aspect entre les deux clichés d'un même échantillon.



Figure 4.6 – Photographies de deux profils morphologiques de gouttes formant des angles de contact substrat-eau très différents sur un même échantillon de mortier recouvert de LP_{dis} après 109h d'exposition aux UV.

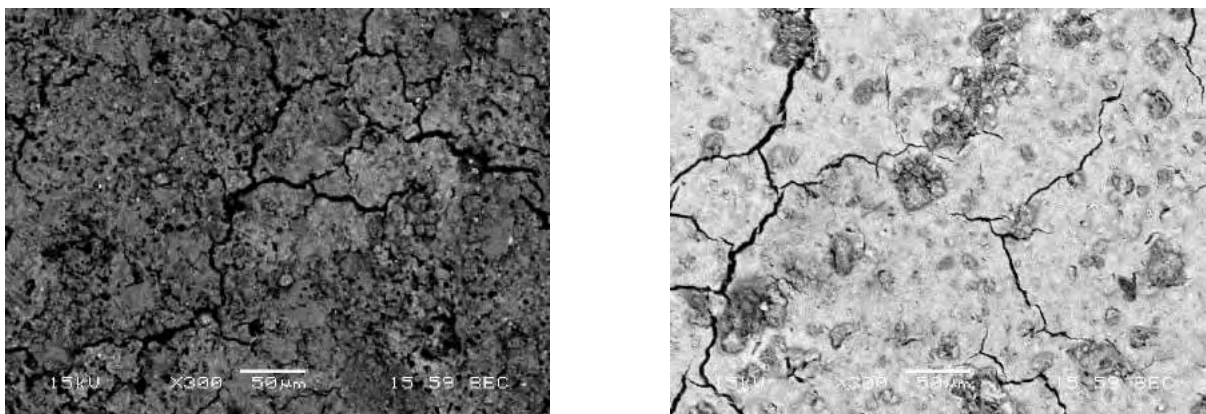


Figure 4.7 – Clichés MEB en mode électrons rétrodiffusés d'un même échantillon de mortier recouvert de LP_{psi} . L'aspect de la surface est très hétérogène. A gauche, une zone où le recouvrement par lasure n'a pas été satisfaisant, la surface semble accidentée et rugueuse. A droite, une zone recouverte de lasure, l'état de surface est plus favorable.

Toutes ces données laissent ainsi présager des propriétés intéressantes pour ce revêtement photocatalytique vis-à-vis de la contamination et de la prolifération microbienne. Outre le phénomène photocatalytique qui permettrait l'inhibition de croissance et/ou la destruction des micro-organismes, le caractère superhydrophile conféré aux matériaux enduits pourrait être un facteur favorable pour prévenir l'adhésion des micro-organismes. Toutefois, le manque d'homogénéité de répartition de la lasure sur les supports est également un paramètre à ne pas négliger. En outre, la présence de pores et de fissures peut fournir des "niches" pour la colonisation microbienne.

4.2.2 Évaluation de l'activité anti-bactérienne

Le chapitre précédent avait pour objectif de souligner les facteurs méthodologiques impactant l'efficacité de l'activité antibactérienne de particules de TiO_2 utilisées seules. L'influence de plusieurs facteurs tels que le contact bactérie/particule et la nature de la suspension d'essai a été mise en évidence. Ce travail préalable a permis de poser les bases nécessaires à l'évaluation des performances antibactériennes et à la compréhension des mécanismes d'action de revêtements photocatalytiques formulés à partir de particules de TiO_2 .

La partie suivante se concentre sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des lasures selon la JIS Z 2801, en boîte de Petri. Certains facteurs d'influence, tel que le pré-vieillessement des échantillons par une exposition à un rayonnement UV, sont présentés. La problématique associée à l'inclusion des particules au sein d'une matrice liante (acrylique) est également exposée.

4.2.2.1 Préparation de supports

4.2.2.1.1 Lasure à base de silicates

Les premiers essais ont été réalisés sur la lasure formulée avec un mélange silicate/acrylique, de l'eau et des particules de TiO_2 photocatalytiques : LP_{psi} .

Des supports de type lamelles de verre ($\approx 19,8 \text{ cm}^2$), généralement utilisées en microscopie optique, ont été utilisés. Avant chaque test, des lamelles ont été recouvertes de lasure au moyen d'un pinceau et ont été placées sous hotte à flux laminaire pour séchage à l'air ambiant. Des lamelles non recouvertes de lasure ont été utilisées comme témoins.

4.2.2.1.2 Lasure sans silicates

Les lasures sans silicate (LP_{dis}) ont été testées sur deux types de supports :

- des lamelles de verre ($19,8 \text{ cm}^2$)
- des membranes Isopore en polycarbonate (Millipore), $0,4 \text{ }\mu\text{m}$, de 47 mm de diamètre ($\approx 17,3 \text{ cm}^2$)

Les deux types de support ont été recouverts avec $0,5 \text{ ml}$ de lasure, déposé à l'aide d'une micropipette, et ont été délicatement orientés dans différentes directions de façon à recouvrir la totalité de leur surface. Après quelques heures de séchage sous PSM, ils ont été placés sous irradiation UV pendant environ 80 h avant le test. Des témoins ont été réalisés avec de la lasure sans particules de TiO_2 .

4.2.2.2 Procédure expérimentale

La procédure suivie pour ces essais a été décrite dans le chapitre 2. Elle est également issue des normes JIS Z 2810 et ISO 27447.

Les supports ont été inoculés avec $400 \text{ }\mu\text{l}$ et déposés dans des boîtes de Petri recouvertes avec un couvercle en borosilicate. Les boîtes ont été placées sous hotte à flux laminaire pour le test et irradiées par une lumière UV ($2,5 \text{ W/m}^2$) ou maintenues dans le noir. Les essais ont été réalisés avec un film recouvrant l'inoculum. Des essais préalables, sans contact forcé, n'avaient montré aucune activité après 2 h de test, dans le noir comme sous irradiation lumineuse.

Après un certains temps, une étape de neutralisation de l'effet antibactérien et une étape de récupération des micro-organismes ont été menées sur les échantillons, telles que décrites dans la partie qui suit.

De même que pour les essais sur les particules de TiO_2 seules, quatre configurations ont été testées en parallèle (Tableau 4.1).

	Irradiation UV	Obscurité
Lasure photocatalytique (avec TiO_2)	X	X
Surface de contrôle (support seul)	X	X

Tableau 4.1 – Tableau synthétique des quatre configurations lancées au cours de chaque test.

Trois échantillons ont été testés par configuration. Les résultats présentés sont une moyenne des trois échantillons avec les erreurs standards correspondantes.

4.2.2.2.1 Neutralisation et récupération

La neutralisation de l'effet antibactérien résiduel et la récupération des cellules bactériennes ont été réalisées en 6 phases (comme préconisé par les normes) :

1. Ajout d'environ 10 ml de bouillon SCDLP (partie 2.4) dans la boîte de Petri
2. Homogénéisation par une série de mouvements en 8 (verticalement et horizontalement)
3. Grattage du support à l'aide d'une spatule stérile pendant 30 secondes

4. Homogénéisation par quelques allers-retours à la micropipette
5. Dilution sérielle au dixième dans un tampon phosphate
6. Ensemencement sur gélose TS ($2 \times 1\text{ml}$ par dilution), incubation 48h à 36°C et lecture.

Afin de s'assurer de l'efficacité du protocole de neutralisation et d'extraction, la procédure a été répétée avant chaque essai, sur 3 échantillons témoins (supports non enduit de lasure) et 3 échantillons dont les surfaces sont recouvertes de lasure, immédiatement après l'inoculation (échantillons $t=0\text{h}$). Si les résultats des échantillons $t=0\text{h}$ indiquaient une diminution significative du nombre de bactéries, l'ensemble des résultats étaient rejetés et l'essai était recommencé.

4.2.2.3 Activité de la lasure photocatalytique contenant des silicates

Les résultats obtenus sur la lasure avec silicates sont présentés sur la Figure 4.8. Il s'agit de l'activité antibactérienne sous irradiation lumineuse, calculée comme la différence entre le nombre de bactéries retrouvées sur témoin (support sans lasure) irradié et le nombre de bactéries retrouvées sur lasure irradiée (moyenne de 3 échantillons).

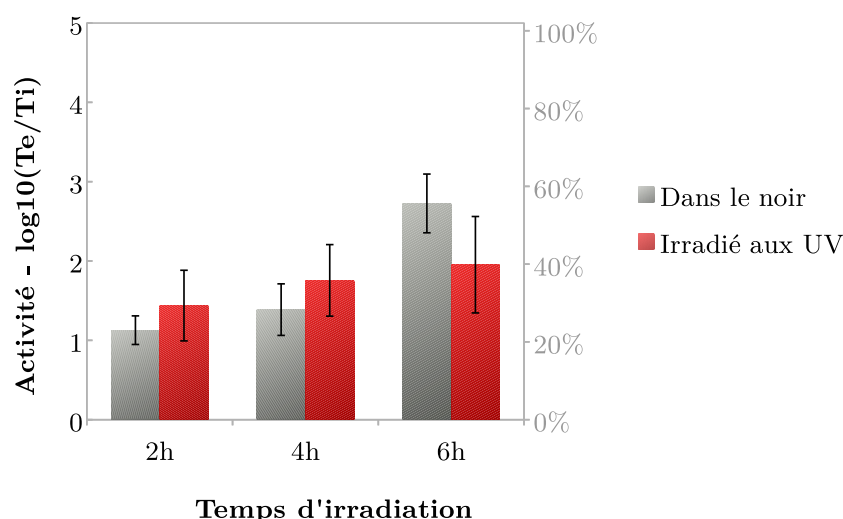


Figure 4.8 – Activité antibactérienne de LP_{psi} , formulée à base de particules de TiO_2 et de silicates. L'échelle de droite indique l'activité relative par rapport à la concentration bactérienne sur témoin. Moyenne \pm es, $n=3$.

Le temps d'irradiation aux UV ne semble pas affecter significativement l'activité, surtout à la vue des erreurs standards relativement élevées. En effet, on observe des valeurs de $1,48 \pm 0,45$ ($p=0,038$), $1,75 \pm 0,45$ ($p=0,015$) et $1,95 \pm 0,61$ ($p=0,033$) après 2h, 4h et 6h respectivement.

On peut constater des activités antibactériennes d'intensité comparables dans le noir, même supérieure après 6h d'essais : $1,13 \pm 0,18$ ($p=0,007$), $1,39 \pm 0,33$ ($p=0,005$) et $2,73 \pm 0,37$ ($p=0,006$) après 2h, 4h et 6h respectivement. Les valeurs se situent dans la gammes des effets faibles à notoires. Ces résultats dans le noir sont du même ordre de grandeur que les activités relevées sur le TiO_2 seul avec contact forcé (chapitre 3).

Une rapide estimation au papier pH nous a permis d'observer une nette variation dans le pH d'une même goutte en contact avec la lasure. En effet, le pH au sein de la goutte était situé

autour de 7 tandis que le pH à la surface de la lasure était d'environ 12 (cf schéma, partie 2.2.2, p. 79). Ainsi, cette information, ajoutée au fait que l'activité détectée dans le noir est supérieure à l'activité détectée sous irradiation après 6h de test, permet de supposer raisonnablement que l'activité antibactérienne détectée avec LP_{psi} n'est pas induite, ou pas seulement, par le processus photocatalytique mais par la présence de silicates alcalins, augmentant la valeur du pH bien au-delà de 7, valeur trop élevée pour la survie des cellules de *E. coli*. Cependant, même si le processus photocatalytique n'est pas actif sur ces lasures, les résultats sont encourageants pour une utilisation de ce type de produit comme revêtement antimicrobien sur matériaux de construction.

Afin de découpler les effets antibactériens (photocatalyse et pH), deux autres lasures ont été formulées sans silicate en augmentant légèrement la quantité d'acrylique.

4.2.2.4 Activité des premières lasures photocatalytiques sans silicates

La figure 4.9 présente les résultats d'activité antibactérienne des lasures formulées sans silicates, avec de l'acrylique (5%-15%), de l'eau ($\approx 80\%$) et du titane en poudre (VLP 7050, 5%). Les témoins ont été réalisés avec une lasure acrylique sans particule photocatalytique.

Les deux lasures n'ont montré que de très faibles efficacités antibactériennes au cours du temps d'irradiation aux UV. La seule valeur d'activité antibactérienne significative ($p=0,013$) était de : $0,40 \pm 0,13 \log$ après 8h d'irradiation pour LP_{p1} . La diminution de l'efficacité de 6h à 8h d'irradiation pour LP_{p2} et les écarts-types élevés témoignent de différences entre la lasure témoin et la lasure photocatalytique qui ne sont pas significatives.

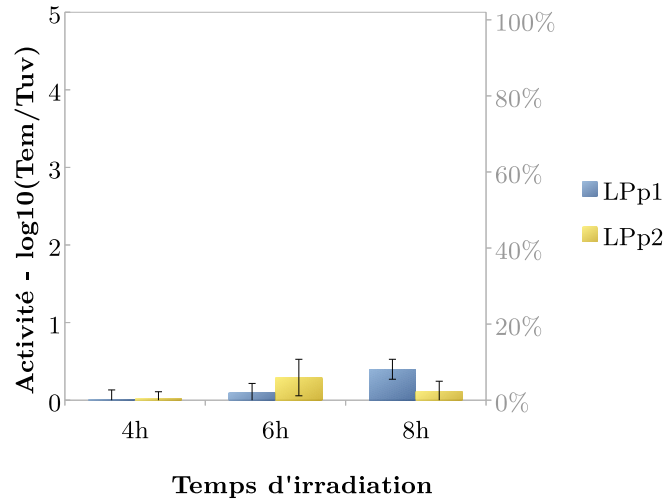


Figure 4.9 – Activité antibactérienne des premières lasures formulées sans silicate. Moyenne \pm es, $n=3$.

- Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les mauvaises efficacités observées :
- un effet d'agglomération des particules, induit par l'utilisation de TiO_2 en poudre générant une mauvaise dispersion des particules en solution
 - un effet d'encapsulation des particules au sein de la lasure, créant une barrière qui filtre les UV et les polluants.

Une quatrième lasure a donc été formulée en utilisant la dispersion commerciale de Kronos (type 7454) (concentrée à 50% en masse sèche de TiO_2) et en réduisant le taux d'acrylique à 2% en masse (Tableau 2.3, p. 79). Une lasure témoin a également été formulée sans TiO_2 avec 98% d'eau et 2% d'acrylique.

Afin de vérifier l'efficacité photocatalytique de la lasure ainsi formulée, des essais d'abattement des NO_x en réacteur, selon un protocole exposé dans l'étude de Martinez *et al.* (2011), ont été réalisés dans les conditions suivantes :

- Concentrations initiales : $\text{NO}_x = 408$ ppb, $\text{NO} = 400$ ppb,
- %HR : entre 40% et 50%
- Débits : air sec = 0,82 L/min, air humide = 0,63 L/min, polluants = 0,5 L/min

La lasure était appliquée sur un support en verre (lamelle de microscope) d'aire égale à $19,76 \text{ cm}^2$.

Les résultats sont présentés à la figure 4.10. Par ailleurs, afin d'évaluer l'éventuel effet bénéfique d'un pré-vieillissement aux UV de la lasure, les essais d'abattement ont été réalisés avant vieillissement et après vieillissement de 80h aux UV. En effet, cette exposition préalable de la lasure aux UV est susceptible de réduire le phénomène d'encapsulation des particules dans la lasure par dégradation partielle des composés organiques la constituant sans endommagement significatif de la résine (Martinez, 2012).

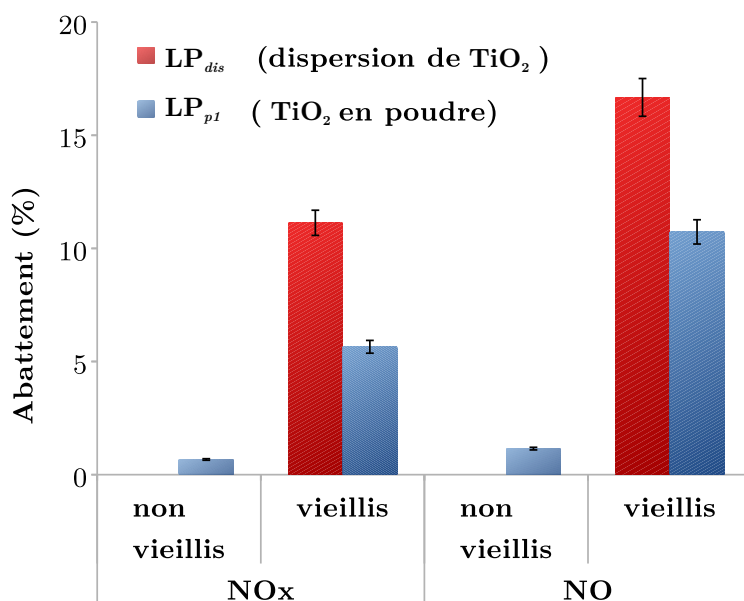


Figure 4.10 – Efficacité des lasures photocatalytiques (formulée avec de l'acrylique et des particules de TiO_2 sous forme de dispersion, LP_{dis} , ou sous forme pulvérulente LP_{p1}) sur l'abattement de NO_x et NO sous irradiation lumineuse

La figure 4.10 montre que sans pré-vieillissement les lasures n'ont aucun effet, ou un effet très léger, sur la dégradation des polluants. Les lasures ayant subi une exposition préalable aux UV (pré-vieillissement) présentent des abattements de 5,7% et 11,1% des NO_x et 10,7% et 16,7% des NO , pour LP_{p1} et LP_{dis} , respectivement. L'effet du pré-vieillissement sur l'efficacité antibactérienne des lasures est également traité dans la suite du chapitre.

Par ailleurs, une fois pré-vieillie, la lasure formulée avec la dispersion chimique de dioxyde de titane présente un abattement des gaz supérieur à celui de la lasure formulée avec des particules de TiO_2 sous forme de poudre : Sur NO_x , 11,13% contre 5,65% et sur NO , 16,67% contre 10,73%, pour la LP_{dis} et LP_{p1} respectivement. Cette nouvelle lasure est donc a priori plus efficace.

4.2.2.5 Lasure formulée à base de titane en dispersion chimique

La partie suivante se concentre sur les résultats des essais sur l'activité antibactérienne (selon la JIS Z 2801) qui ont été réalisés sur la lasure incluant une dispersion chimique de particule de TiO_2 (Kronos, type 7454) : LP_{dis} .

La formule de la dispersion étant confidentielle, nous n'avons pas pu obtenir d'information sur la nature et la famille du dispersant qui est utilisé pour stabiliser les particules de TiO_2 . C'est pourquoi, les éventuels effets antibactériens du dispersant chimique en lui-même n'ont pas pu être pris en compte.

Une lasure avec la même quantité d'acrylique mais sans particule de TiO_2 photocatalytique a été utilisée comme témoin. Pour les essais sur la dispersion, des lamelles de verre non recouvertes ont été utilisées comme surface de contrôle témoin. Un comparatif de l'efficacité avant / après inclusion des particules de TiO_2 est notamment détaillé. Nous nous sommes également intéressés à l'influence de la concentration bactérienne et du pré-vieillessement des lasures.

4.2.2.5.1 Effet de l'inclusion en lasure

La figure 4.11 présente les résultats des tests en boîte de Petri réalisés sur les supports en verre recouverts :

1. de lasure LP_{dis}
2. ou d'une solution aqueuse contenant 5% en masse de la dispersion chimique VLP7454 seule, sans liant ajouté.

La lasure ne présente pas d'activité dans le noir et les activités antibactériennes calculées après 2h, 4h et 6h d'irradiation sont respectivement de $0,53 \pm 0,1 \log$ ($p=0,241$), $0,96 \pm 0,43 \log$ ($p=0,018$) et $0,79 \pm 0,11 \log$ ($p<0,03$). Les valeurs après 4h et 6h d'essai sont significatives et correspondent à des effets bactéricides faibles, autour de 20% d'inactivation.

Ces résultats confirment l'hypothèse d'une activité antibactérienne liée au pH alcalin pour la lasure avec silicates (LP_{psi} , figure 4.8). Ils montrent également une nette augmentation d'activité comparativement aux essais réalisés sur les lasures à base de TiO_2 en poudre non dispersée, sur lesquelles quasiment aucune activité n'a été détectée après 8h d'irradiation. Cette différence peut être attribuée à l'usage d'un TiO_2 dispersé chimiquement, au sein duquel les particules stabilisées peuvent offrir une plus grande surface active pour les réactions photocatalytiques.

En outre, le faible taux de résine acrylique contenu dans cette lasure (2%) a certainement contribué à réduire les phénomènes d'encapsulations des particules dans la matrice liante. Cette hypothèse est en partie confirmée par les résultats de la dispersion de TiO_2 utilisée seule. L'activité antibactérienne calculée est, pour la dispersion diluée, de $0,43 \pm 0,01$ ($p=0,001$) après 2 h de test et $1,52 \pm 0,19$ ($p=0,007$) après 4 h. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues sur la lasure. Après 4h d'irradiation, la dispersion présente une activité légèrement supérieure.

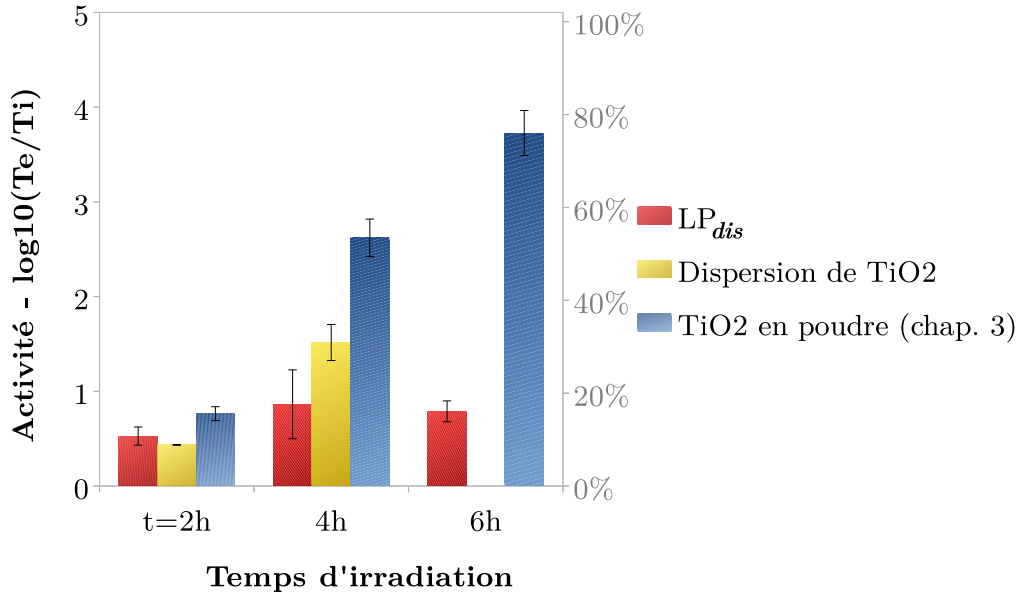


Figure 4.11 – Activité antibactérienne de la lasure LP_{dis}, de la dispersion chimique VLP7454 (diluée à 5%) et des particules de TiO₂ seules (chap. 3), irradiées par une lumière UV. Moyenne±es, n=3.

Dans tous les cas, ces valeurs sont nettement inférieures aux activités relevées avec le TiO₂ seul, pour un dosage beaucoup plus faible, $\approx 0,04 \text{ mg/cm}^2$ (cf chapitre 3, efficacité de 2,62 log après 4h et 3,73 log après 6h de test).

Rappelons que pour chacun des essais réalisés, des échantillons (témoins et photocatalytiques) étaient également maintenus en conditions de test (température, hygrométrie) mais dans le noir. Concernant la dispersion chimique, la moyenne des nombres d'UFC retrouvés sur les témoins (surfaces de contrôle non recouvertes) était de $4,48 \pm 0,04 \text{ log}$ après 4 h d'essai dans le noir. Les nombres d'UFC retrouvés sur les lamelles recouvertes de dispersion chimique était de $4,62 \pm 0,001 \text{ log}$. La dispersion chimique ne présente aucune action antibactérienne dans le noir après 4h d'essai. Ainsi, même si le dispersant chimique n'a pas pu être testé seul (sans particules de TiO₂), il est raisonnable de supposer qu'il n'a pas d'effet négatif sur la survie des cellules bactériennes d'*E. coli*.

Concernant la lasure photocatalytique, l'inclusion des particules dans une matrice organique réduit donc considérablement l'efficacité de la désinfection photocatalytique. L'effet du phénomène d'encapsulation des particules dans la masse de l'acrylique conduirait à la filtration des UV et au masquage des sites actifs du catalyseur.

4.2.2.5.2 Influence de la concentration de l'inoculum

Les essais d'activité antibactérienne basés sur la JIS Z 2801 ont été réalisés sur la lasure LP_{dis} et une lasure témoin non photocatalytique selon la méthode décrite dans la partie 2.6, avec un inoculum dosé entre $2,5 \times 10^5$ et 10×10^5 . Deux autres essais ont également été menés, pendant 2 h et 4 h d'irradiation, dans les mêmes conditions et avec une concentration bactérienne de l'inoculum égale à 9×10^4 .

L'influence de la concentration bactérienne de l'inoculum est présentée sur la figure 4.12.

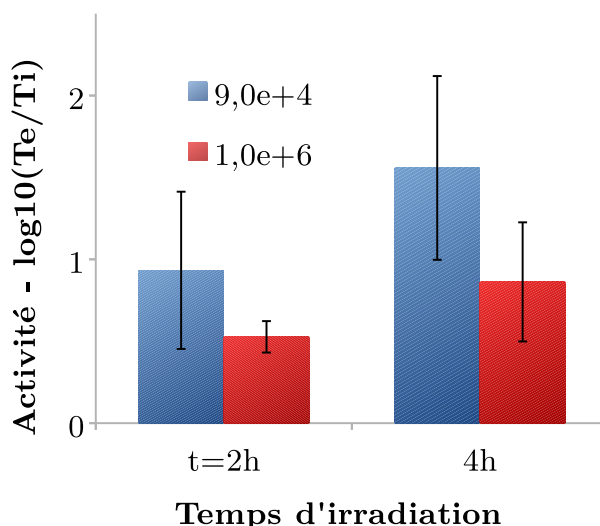


Figure 4.12 – Activité antibactérienne de la lasure LP_{dis} irradiée par des UV, selon de la concentration bactérienne de l'inoculum. Moyenne \pm se, $n=3$.

Aucune activité n'a été détectée dans le noir pour les deux concentrations. Les activités relevées après une irradiation lumineuse UV sont de $0,933 \pm 0,48 \log$ ($p=0,087$) après 2h et $1,56 \pm 0,56 \log$ ($p=0,033$) après 4h d'irradiation pour la concentration de l'inoculum de 9×10^4 .

Malgré des erreurs standards relativement fortes, on constate une activité significativement plus élevée pour la concentration la plus faible (inférieure d'un logarithme par rapport à la concentration la plus forte) pour le temps de 4h d'irradiation.

Ces résultats concordent avec les études relevées dans la bibliographie (Matsunaga *et al.*, 1988; Sunada *et al.*, 2003) montrant une diminution de l'efficacité photocatalytique lorsque la charge bactérienne de la suspension augmente.

On peut supposer deux phénomènes combinés pour expliquer cette baisse d'activité :

1. le nombre élevé de bactéries nécessite une plus grande quantité de TiO_2 pour obtenir les mêmes taux de dégradation,
2. la dégradation d'un plus grand nombre de bactéries entraîne la production d'une plus grande quantité de matières organiques (restes cellulaires) accaparant les sites actifs de la lasure.

La dernière hypothèse pourrait être vérifiée par une série d'essais, qui permettraient d'observer si l'efficacité diminue avec le nombre de cycles, traduisant un phénomène "d'encrassement".

4.2.2.5.3 Influence du pré-vieillessement des lasures

La figure 4.13 présente l'activité antibactérienne de la lasure LP_{dis} sur membrane, après 4 heures de test, en fonction du temps de pré-vieillessement des échantillons.

On peut observer une augmentation de l'efficacité antibactérienne de la lasure lorsque le temps d'exposition aux UV avant le test est augmenté. L'activité antibactérienne est de $0,20 \pm 0,06 \log$ ($p=0,016$) sur les échantillons qui n'ont pas été pré-vieillis et de $1,22 \pm 0,13 \log$ ($p<0,001$) sur les échantillons pré-vieillis pendant 109 h.

La figure 4.13 montre également l'évolution de l'angle de contact en fonction du temps de pré-vieillissement (cf partie 4.2.1). On constate que l'angle de contact le plus faible (autour de 10°) est obtenu dès 48h de pré-vieillissement. De la même manière, l'activité antibactérienne est plus importante sur ces échantillons que sur ceux qui n'ont pas été pré-veillis. Pour ce temps de pré-vieillissement (48 h), l'apparition du caractère hydrophile de la lasure est concomitant avec une augmentation significative de l'activité antibactérienne. Un rapprochement des bactéries des sites actifs de la lasure est une explication probable.

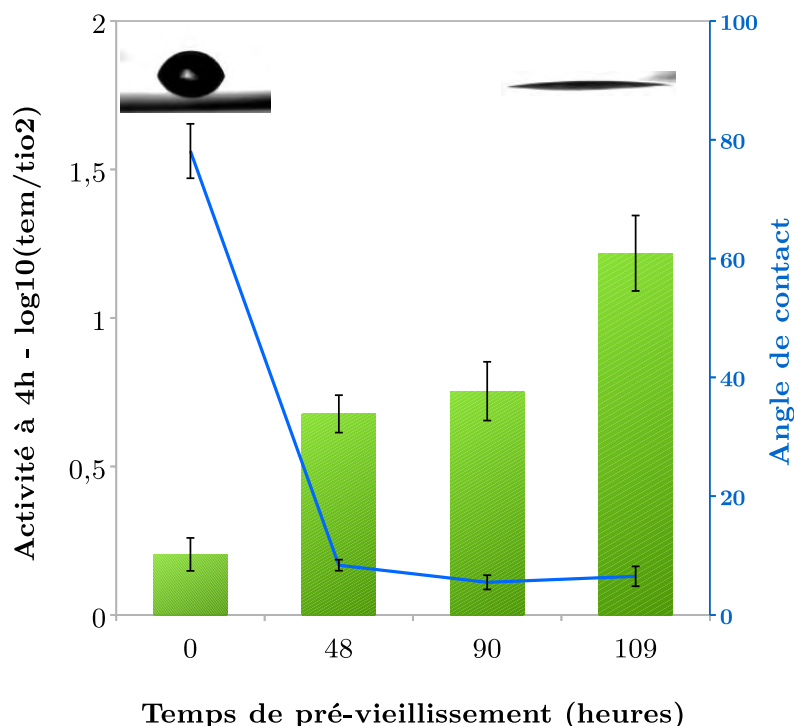


Figure 4.13 – Activité antibactérienne de la lasure LP_{dis} sur *E. coli* après 4h de test, en fonction du temps de pré-vieillissement aux UV ($\approx 3 \text{ W/m}^2$). Moyenne \pm es, $n=3$. La courbe bleue représente les valeurs d'angles de contact mesurées sur les membranes aux échéances correspondantes (cf partie 4.2.1).

Cependant, on observe aussi une augmentation de l'activité après 109 h de pré-vieillissement alors que l'angle de contact est constant autour de 10° . Ainsi, si le caractère hydrophile a un impact sur l'activité antibactérienne de la lasure pour des temps de pré-vieillissement inférieurs à 90 h, d'autres phénomènes semblent impliqués au-delà de ce temps de pré-vieillissement.

Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont montré que l'efficacité de la réaction photocatalytique était indépendante du caractère superhydrophile photo-induit du TiO_2 (Fujishima *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003), même si les angles de contact les plus faibles sont essentiellement retrouvés sur les matériaux avec la meilleure activité photocatalytique (Diamanti *et al.*, 2008).

Une explication possible à ces résultats peut résider dans le fait que le pré-vieillissement aux UV, au-delà d'augmenter le caractère hydrophile de la lasure photocatalytique, conduit à un mécanisme de désencapsulation des particules dans la matrice liante. En irradiant les échantillons avant le test, les particules encapsulées proches de la surface recevraient une partie du

rayonnement UV, permettant d'activer le processus photocatalytique. Le revêtement organique serait alors dégradé partiellement, engendrant la création d'une porosité additionnelle dans la lasure. L'apparition de nouveaux pores permettrait ainsi de faciliter :

- (i) l'accès des UV pour une meilleure activation,
- (ii) l'accès des polluants (bactéries) vers les particules,
- (iii) la diffusion des radicaux vers les polluants, comme l'illustre le schéma de la figure 4.14.

L'augmentation de la porosité induite par la dégradation de la résine organique (acrylique) peut conduire à l'émergence d'une nouvelle problématique : la libération d'une certaine quantité de particules, pouvant entraîner (i) la diminution de l'efficacité de la lasure et (ii) l'apparition d'un risque pour la santé.

L'utilisation de silicates dans la formulation, qui servent de liant inorganique capable de résister au processus de dégradation photocatalytique, permettrait de palier à ce problème (Martinez, 2012).

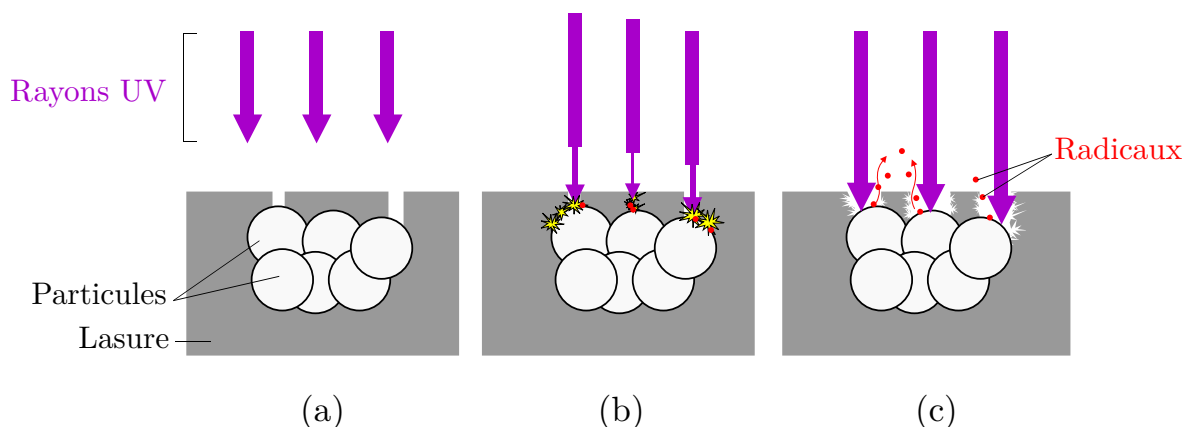


Figure 4.14 – Schéma de principe de la libération des nanoparticules encapsulées. (a) Début du pré-vieillissement aux UV ; (b) une faible intensité d'UV atteint les nanoparticules proches de la surface et la réaction photocatalytique commence, la matrice liante se dégrade peu à peu autour des particules. (c) la dégradation de la matrice fait apparaître une porosité supplémentaire, qui augmentant l'accès des UV et facilite la diffusion des composés actifs (radicaux) vers l'extérieur ou des polluants (et micro-organismes) vers les particules.

Les lasures formulées ont montré des activités antibactériennes significatives sur *E. coli* en boîte de Petri. La première lasure formulée à base de particules de TiO_2 et de silicates présentait une efficacité même dans le noir, principalement attribuée à son alcalinité. La deuxième lasure, testée sans silicate afin d'évaluer son efficacité photocatalytique, présentait des activités plus faibles mais néanmoins notables. Notons que les expériences ont été réalisées dans des conditions de faible irradiance ($2,5 \text{ W/m}^2$). L'impact du pré-vieillissement par une exposition aux UV en amont du test a été souligné : l'efficacité de la lasure augmente avec le temps de pré-irradiation. Ces résultats d'inactivation bactérienne, combinés au caractère super-hydrophile photo-induit des lasures laissent présager une activité antibactérienne dès le contact, notamment des propriétés de résistance à l'adhésion à la surface. Par ailleurs, en condition réelle, le caractère super-hydrophile permettrait de nettoyer la surface des déchets bactériens sur le long terme.

La partie suivante se concentre sur la mise en œuvre d'essais de résistance à la formation de biofilms sur des matériaux cimentaires recouverts de lasure LP_{dis} photocatalytique.

4.2.3 Évaluation de la formation de biofilm sur revêtement photocatalytique

Les essais de formation de biofilms visent à évaluer la capacité des matériaux à prévenir l'adhésion et la prolifération de micro-organismes. Ce type d'essai est mené en milieu liquide et met en jeu la sédimentation de cellules bactériennes sur un matériau. Le milieu est constitué de manière à placer les bactéries en état de stress favorisant leur développement sous forme de biofilms. Les résultats sont exploités en termes d'UFC par cm^2 de matériau.

Le méthodologie mise en œuvre dans cette partie repose sur le couplage d'une évaluation par dénombrement avec une série d'observations au microscope à épifluorescence afin de rendre compte de la répartition de la biomasse bactérienne sur les échantillons. Des clichés au microscope électronique à balayage ont également été réalisés en complément dans le but d'observer le comportement bactérien à l'échelle cellulaire.

4.2.3.1 Méthodes

Les essais ont été réalisés dans des microplaques multipuits. Les échantillons de pâte de ciment, recouverts de LP_{dis} (5% d'une dispersion de TiO_2 , 2% d'acrylique, 93% d'eau) ou de lasure témoin ne contenant pas de particules photocatalytiques (2% d'acrylique, 98% d'eau) ont été pré-vieillis aux UV pendant environ 100 h puis ils ont été placés dans des plaques de 6 puits (3 échantillons avec TiO_2 et 3 échantillons sans TiO_2 par plaque). Pour mémoire, les pâtes de ciment avaient subi une lixiviation pendant 15 jours afin d'en diminuer le pH de surface jusqu'à une valeur située autour de 7-8.

La procédure de l'essai, d'une durée de 24 h, est décrite dans le chapitre 2, p. 96.

En raison d'une grande hétérogénéité dans les résultats, le test a été mis en œuvre 3 fois. Les résultats présentent la moyenne de 9 échantillons sur 3 essais. Un test t de Student a également été effectué afin de vérifier que les différences constatées étaient significatives.

4.2.3.2 Résultats d'essais

Les quantités de biomasses viables qui adhéraient aux échantillons après 24h d'expérience sont présentées sur la figure 4.15.

Une très légère différence peut être observée entre les échantillons témoins (recouverts de lasure non photocatalytique) dans le noir et exposés aux UV ($-0,20 \log$). Mais cette différence n'est pas significative ($p=0,128$).

Concernant les échantillons dans le noir (lasure témoin et LP_{dis}), on peut également observer une légère différence dans le nombre de bactéries entre les échantillons couverts de lasure photocatalytique et les échantillons couverts de lasure témoin sans particules de TiO_2 .

Or, il a été montré dans la partie 4.2.1 qu'une exposition préalable aux UV durant une centaine d'heures permettait de développer un caractère hydrophile des lasures photocatalytiques recouvrant les échantillons de pâte de ciment. En outre, le phénomène n'a pas été détecté sur les échantillons recouverts de lasure témoin.

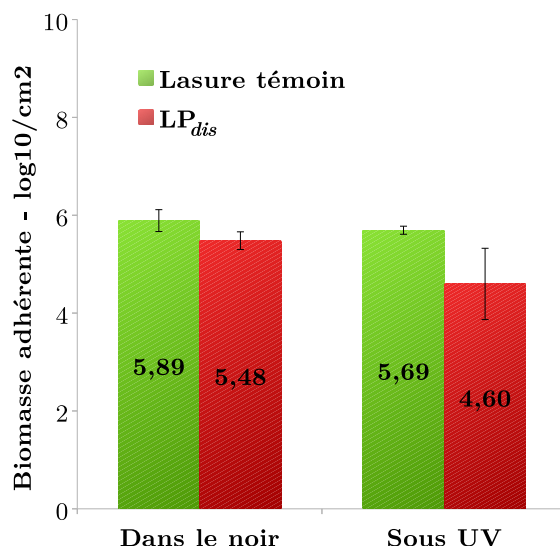


Figure 4.15 – Nombre de cellules adhérentes viables sur les échantillons après 24h. Moyenne±es, n=9 (3 essais).

Par ailleurs, la littérature souligne que les matériaux hydrophiles sont moins sensibles à l'adhésion des micro-organismes, y compris en milieu aqueux (Busscher et Weerkamp, 1987; Faille *et al.*, 2002; Fletcher et Loeb, 1979).

Concernant la rémanence du caractère superhydrophile photo-induit, l'étude de Yu *et al.* (2003) montre que les angles mesurés sur des films de TiO₂ préalablement irradiés aux UV retrouvent leurs valeurs initiales après environ 14 jours de stockage dans le noir. Après 1 jour de stockage, les angles retrouvent environ 50% de leurs valeurs initiales.

Les essais de formation de biofilm sont réalisés sur 24 h. Ainsi, la différence constatée entre les deux échantillons maintenus dans le noir pourrait s'expliquer par l'apparition d'un caractère hydrophile de la lasure. Toutefois, la différence constatée entre les 3 essais n'est pas significative ($p=0,077$), suggérant que, dans cette expérience, l'hydrophilie induit un effet limité sur l'adhésion et la prolifération des bactéries adhérentes. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer ces résultats :

1. l'hydrophilie n'est pas une propriété intrinsèque de la lasure mais conférée par l'irradiation des particules de TiO₂. Ainsi, il est possible que la rémanence du caractère hydrophile ne dure pas 24 h lorsque les échantillons ne sont plus irradiés,
2. l'immersion des échantillons dans un milieu aqueux contenant de la matière organique pourrait entraîner des interactions avec la lasure neutralisant le caractère hydrophile,
3. la rugosité importante et la porosité de surface qui caractérisent ces matériaux pourraient fournir de nombreux points d'accroche aux micro-organismes, des "niches", pour se développer.

Le nombre de cellules viables adhérentes sur les échantillons LP_{dis} était de 4,60 log/cm², après 24h d'exposition aux UV. Cela correspond à une différence de 1,29 log par rapport aux témoins maintenus dans le noir et 0,88 log par rapport aux échantillons LP_{dis} maintenus dans le noir également. Ces effets sont significatifs ($p=0,005$). La lecture des résultats a été effectuée

après 24h de test. Aussi, il est impossible de conclure sur la phase de formation du biofilm qui est impactée. Trois hypothèses sont néanmoins envisageables :

1. le grand nombre de pores et de fissures détectés sur la lasure grâce aux observations au MEB pourraient fournir des micro-cavités, sans TiO_2 , où les micro-organismes peuvent adhérer et croître,
2. seule une infime partie du rayonnement UV atteindrait la lasure à travers le bouillon biofilm, réduisant l'activation du photocatalyseur,
3. les particules seraient trop enveloppées dans la lasure pour pouvoir réagir

En complément de ces essais, des séries d'observations au microscope à épifluorescence et au MEB ont été réalisées sur des échantillons après 24h en conditions de test biofilm.

4.2.3.3 Évaluation qualitative de la formation de biofilm

4.2.3.3.1 Observation de la colonisation bactérienne au microscope à épifluorescence

Les observations au microscope à épifluorescence permettent d'avoir un aperçu de la contamination globale d'un échantillon, en offrant une image de la micro-flore totale qui adhère à la surface. Cette technique est largement utilisée en microbiologie pour sa simplicité et sa rapidité d'exécution (Allion, 2004).

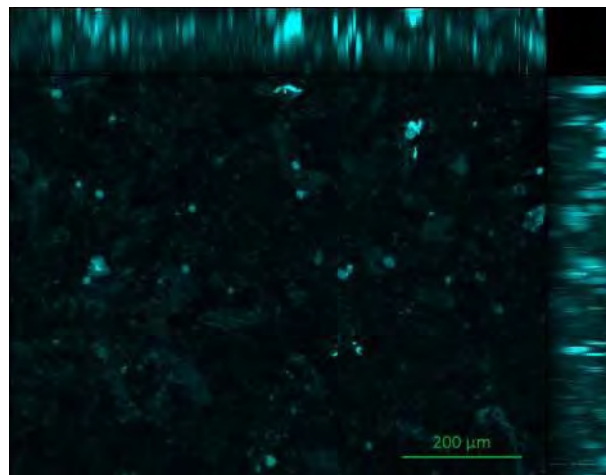
Pour les observations, un test de résistance aux biofilms a été réalisé de la même manière que précédemment. Après le dernier rinçage à 24h, 6 ml de bouillon ont été rajoutés dans les puits avec 75 μl de Syto9, qui est un colorant intercalant de l'ADN capable de pénétrer les membranes lésées et intactes et de rendre les cellules visibles en fluorescence. Après 10 minutes, les échantillons ont été placés sous le microscope pour les observations.

La fluorescence du support est une problématique essentielle qu'il faut prendre en compte car elle peut entraver toute observation. Dans notre cas, la fluorescence des matériaux a été détectée à certains endroits. Afin de pouvoir distinguer les bactéries du matériau support, un deuxième filtre de longueur d'onde différente a été appliqué. Une étape de seuillage a été menée précautionneusement. Après l'application des deux filtres, la biomasse bactérienne a pu être détectée et séparée visuellement du matériaux.

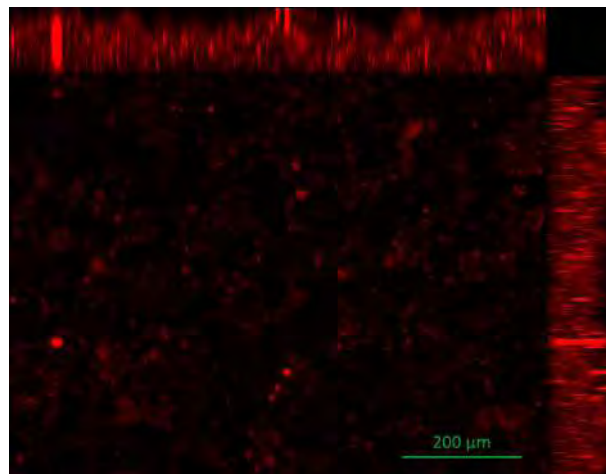
La figure 4.16 montre les étapes d'application des filtres au cours d'une observation. Il est important de noter que si les bactéries et le matériau ré-émettent dans les mêmes longueurs d'ondes, toute observation devient difficile, voire impossible.

Les 2 types de lasure ainsi que la pâte de ciment support semblent émettre dans une gamme de longueurs d'ondes différentes des bactéries, comme le montre la figure 4.17. Les deux clichés pris sur les lasures témoins, dans le noir et irradiés aux UV, révèlent des contaminations bactériennes réparties sur l'ensemble des matériaux.

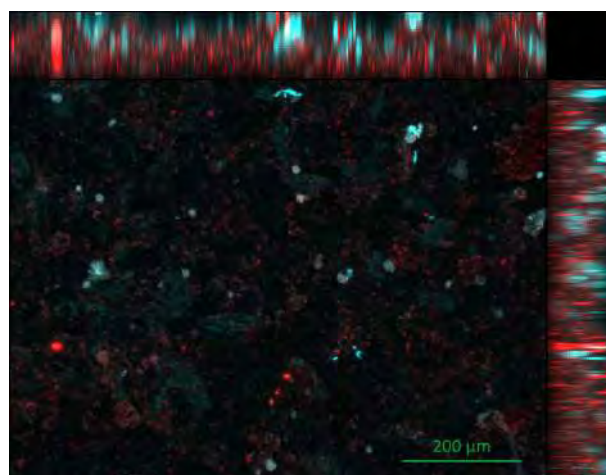
L'échantillon recouvert de lasure photocatalytique a montré des états de surfaces intéressants, présentés sur les 2 photos du bas de la figure 4.17.



(a) Application d'un premier filtre ; le matériau émet fortement



(b) Application d'un deuxième filtre pour les bactéries



(c) Le couplage des deux filtres permet la distinction bactéries-matériaux.

Figure 4.16 – Clichés des différentes étapes de filtrage et seuillage des images obtenues au microscope à épifluorescence sur un échantillon recouvert de lasure témoin et maintenu dans le noir.

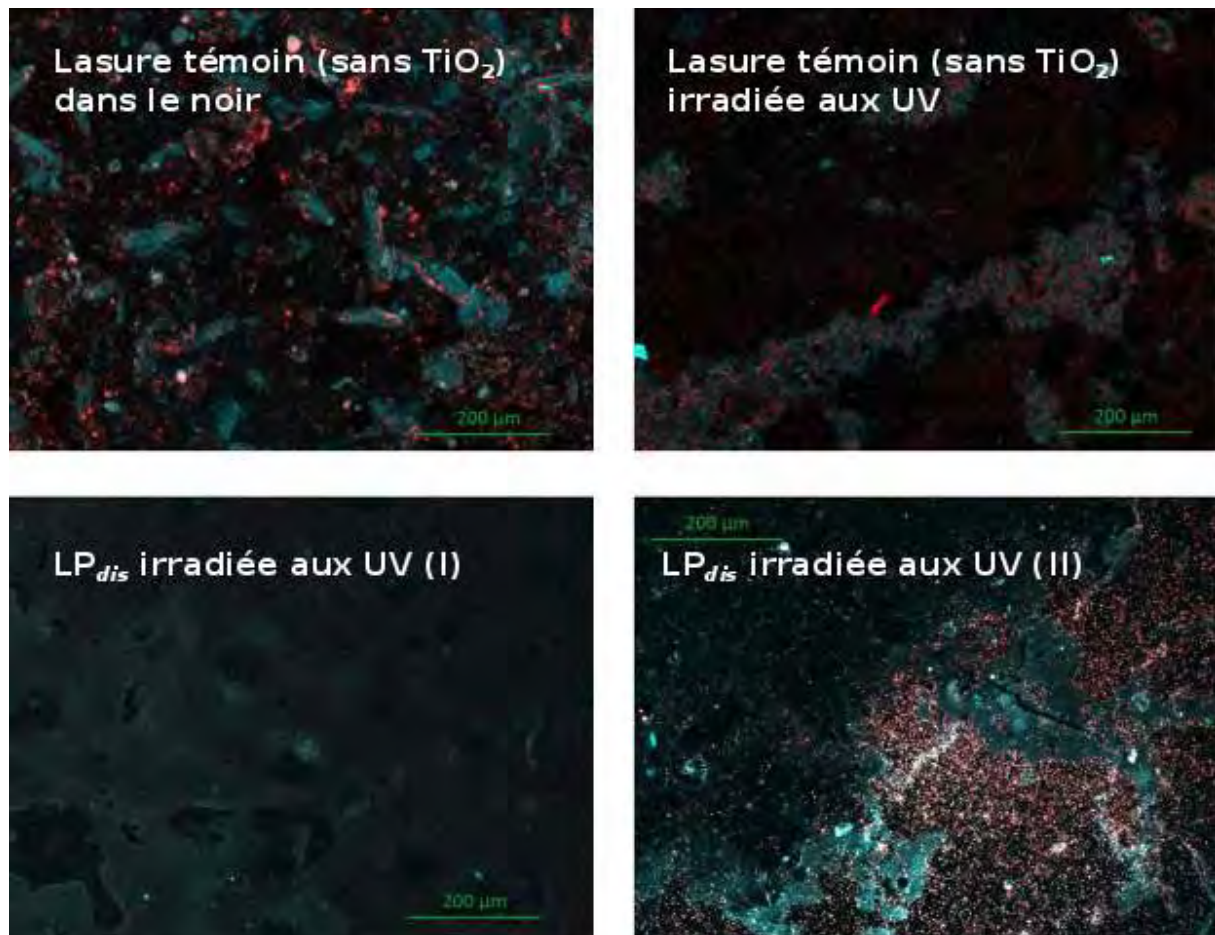


Figure 4.17 – Clichés au microscope à épifluorescence des échantillons après 24h d'essai biofilm. Pour les échantillons LP_{dis}, les photographies ont été réalisées (I) au centre de l'échantillon et (II) en bordure de l'échantillon.

La photo (I), réalisée au centre de l'échantillon, révèle une contamination répartie sur toute la surface mais très faible, avec des cellules bactériennes très éloignées les unes des autres. La photographie (II) a été réalisée en bordure de l'échantillon. On peut y observer un grand nombre de cellules bactériennes, rassemblées aux endroits où la lasure n'est pas homogène. On distingue clairement que la colonisation suit les contours de la lasure et s'étale directement sur la pâte de ciment.

L'essai repose sur le principe d'une contamination des échantillons par sédimentation des cellules bactériennes sur le matériau. Ces résultats laissent penser que, pour cet échantillon, ce sont les bactéries ayant contaminé le matériau cimentaire en dehors de la lasure qui ont été principalement capables de se développer. Pour mémoire, les pâtes de ciment supports avaient subi un pré-traitement visant à diminuer leur pH de surface jusqu'à 7-8.

Ces constats sont à mettre en parallèle avec les dénombrement des UFC réalisés au cours des essais précédents. Ils pourraient notamment expliquer la grande dispersion obtenue entre les essais. En effet, lors de l'étape de récupération des bactéries, le grattage des échantillons est réalisé sur la totalité de la surface supérieure. Il est ainsi probable que les cellules développées en bordure ait été récupérées, dans le cas où la lasure ne recouvre pas de manière homogène l'échantillon.

Ainsi, il est possible que l'activité anti-biofilm soit sous-estimée dans les essais précédents (partie 4.2.3.2).

4.2.3.3.2 Observations au MEB

Des observations au microscope électronique à balayage ont également été menées dans le but d'appréhender au mieux le mode de développement des bactéries sur ces matériaux et de mettre en lumière les mécanismes d'action de la lasure.

La figure 4.18 montre des images acquises sur les échantillons témoins non photocatalytiques, maintenus dans le noir et irradiés aux UV, et sur l'échantillon recouvert de LP_{dis} (photocatalytique) et maintenu dans le noir. Les trois échantillons montrent le même type de colonisation. Sur les plans larges, on peut observer de nombreuses protubérances arrondies, regroupées entre elles pour former un ensemble cohésif. Sur les plans plus rapprochés (b), (d), et (f) on peut distinguer un grand nombre de cellules bactériennes, à la surface de la substance ou nichées à l'intérieur de celle-ci. Les clichés réalisés ont montré les mêmes morphologies de prolifération pour les trois échantillons contaminés. Ces observations ne permettent pas d'identifier la substance mais son apparition est liée à la présence des bactéries (elle n'a pas été observée sur les échantillons non contaminés). Des études complémentaires seraient nécessaires pour identifier cette substance qui semble être d'origine organique.

Les images de la figure 4.19 ont été acquises sur un échantillon recouvert de LP_{dis} après 24h d'exposition aux UV en condition de test. Les différents agrandissements permettent de distinguer la présence de quelques bactéries et des petites protubérances arrondies, différenciables sur le cliché (c).

Les images présentées sur la figure 4.20 ont également été prises sur l'échantillon LP_{dis} irradié aux UV. Les photographies présentent des amas de plusieurs cellules bactériennes mortes, totalement déformées. Sur les figures 4.20 (d) et (e), on peut distinguer de petits agrégats fixés

aux parois des cellules. Ces particules, de taille largement sub-micrométrique, sont probablement des particules de TiO_2 ayant pu participer à la dégradation des cellules bactériennes. Ces regroupements de cellules déformées ont été retrouvés à plusieurs endroits de l'échantillon et n'ont pas été détectés sur les témoins dans le noir et sans TiO_2 . Sur les clichés (a) et (b), on peut observer des cellules intactes, retrouvées sur la lasure témoin (sans TiO_2 photocatalytique) maintenue dans le noir pendant l'expérience.

4.2.4 Synthèse des résultats sur lasure photocatalytique

Plusieurs points peuvent être dégagés des résultats obtenus à partir des différentes analyses :

1. la mesure quantitative par comptage des UFC nous renseigne sur un effet antibactérien de la lasure LP_{dis} . Les écarts trouvés entre certains essais (traduits par une erreur standard significative) peuvent être liés à une répartition non régulière de la lasure sur le matériau ou une dispersion non optimale des particules de TiO_2 au sein de la lasure, introduisant des disparités dans l'efficacité des différents échantillons,
2. les observations au microscope à épifluorescence sur un échantillon irradié montrent une lasure fluorescente qui apparaît comme libre de prolifération et une forte densité bactérienne en dehors de celle-ci, sur le bord de l'échantillon. Ces résultats suggèrent également une activité antibactérienne de la lasure,
3. Les observations au microscope électronique à balayage indiquent une contamination quasi-intégrale de la lasure par une substance *a priori* organique, liée à la présence des bactéries, et des groupes de bactéries mortes, dont les parois sont parsemées d'amas de taille décimicrométrique apparentés à des particules de TiO_2 . Ces résultats traduisent des effets localisés sur les cellules bactériennes plutôt qu'une action répartie contre la formation de biofilms.

Les essais développés dans cette partie permettent d'évaluer les propriétés antibactériennes conférées à des matériaux de construction photocatalytiques. La démarche adoptée est relativement complète dans le sens où elle fournit des résultats quantitatifs et qualitatifs. Cette méthodologie peut également être utilisée pour évaluer la croissance et la propagation de micro-organismes à la surface d'autres types de matériaux.

Concernant l'épifluorescence, une analyse quantitative peut également être envisagée en calculant le pourcentage de surface colonisée par analyse d'images. Cependant, les informations obtenues ne tiendront pas compte des amas bactériens trop importants et ne seront pas aussi précises qu'un dénombrement des UFC. Des études complémentaires pourraient aussi être menées avec des organismes génétiquement modifiés, ne nécessitant pas de fluorochromes, dans le but d'observer l'évolution de la colonisation de matériaux dans le temps, au moyen de photos prises à intervalles réguliers. En outre, l'utilisation de fluorochromes tels que l'iodure de propidium, capable de pénétrer seulement au travers des membranes endommagées donnerait des informations supplémentaires concernant la viabilité des organismes. L'évaluation de matériaux antimicrobiens serait ainsi plus précise. Certaines précautions doivent toutefois être prises quant à la fluorescence des matériaux supports. Particulièrement vis-à-vis des matériaux cimentaires, qui sont sujets à la carbonatation (cf chapitre 2).

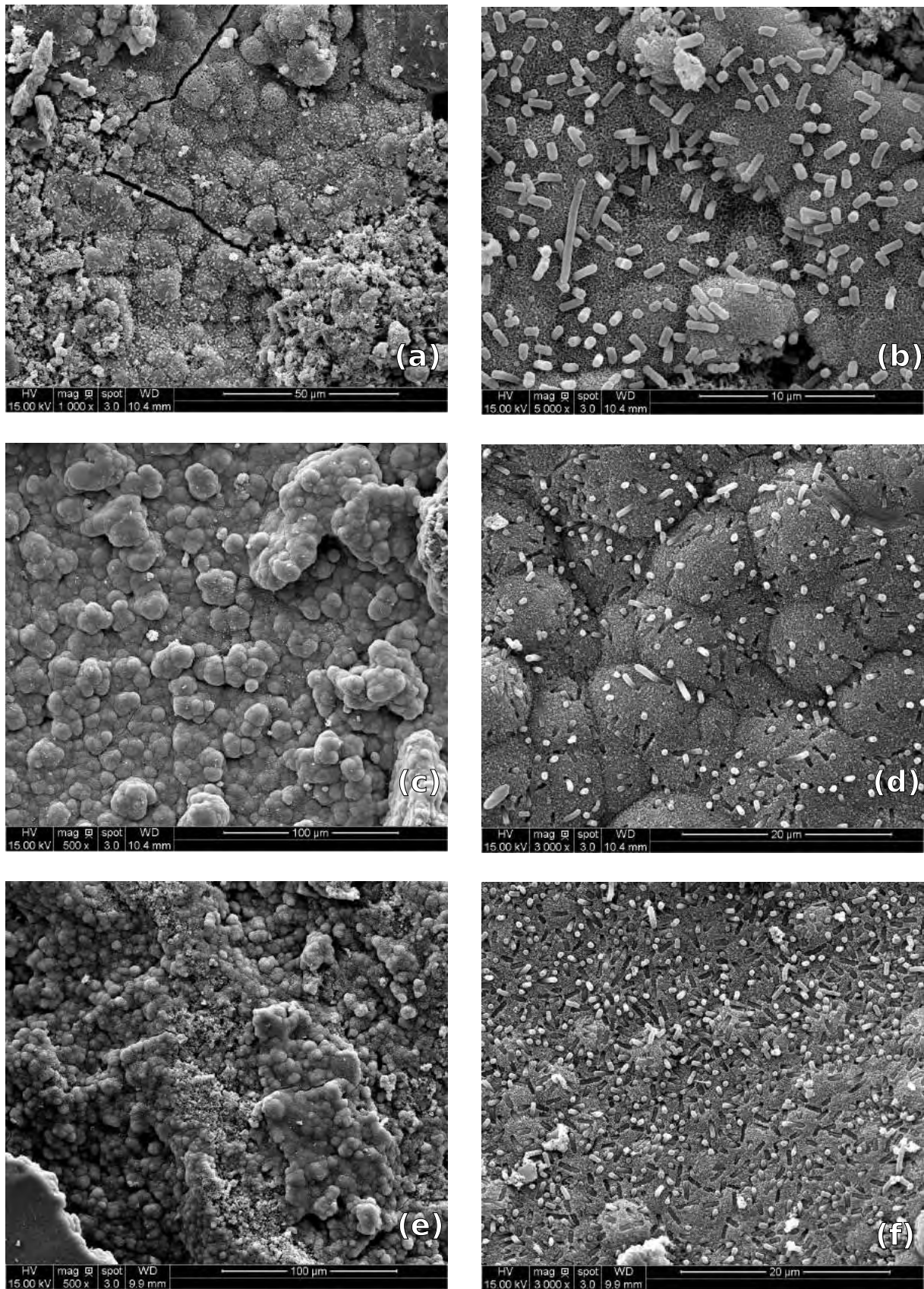


Figure 4.18 – Clichés MEB (mode SE) des échantillons de pâte de ciment. (a) et (b) : recouverts de lasure témoin et conservés dans le noir ; (c) et (d) : recouverts de lasure témoin et exposés aux UV ; (e) et (f) : recouverts de LP_{dis} et conservés dans le noir.

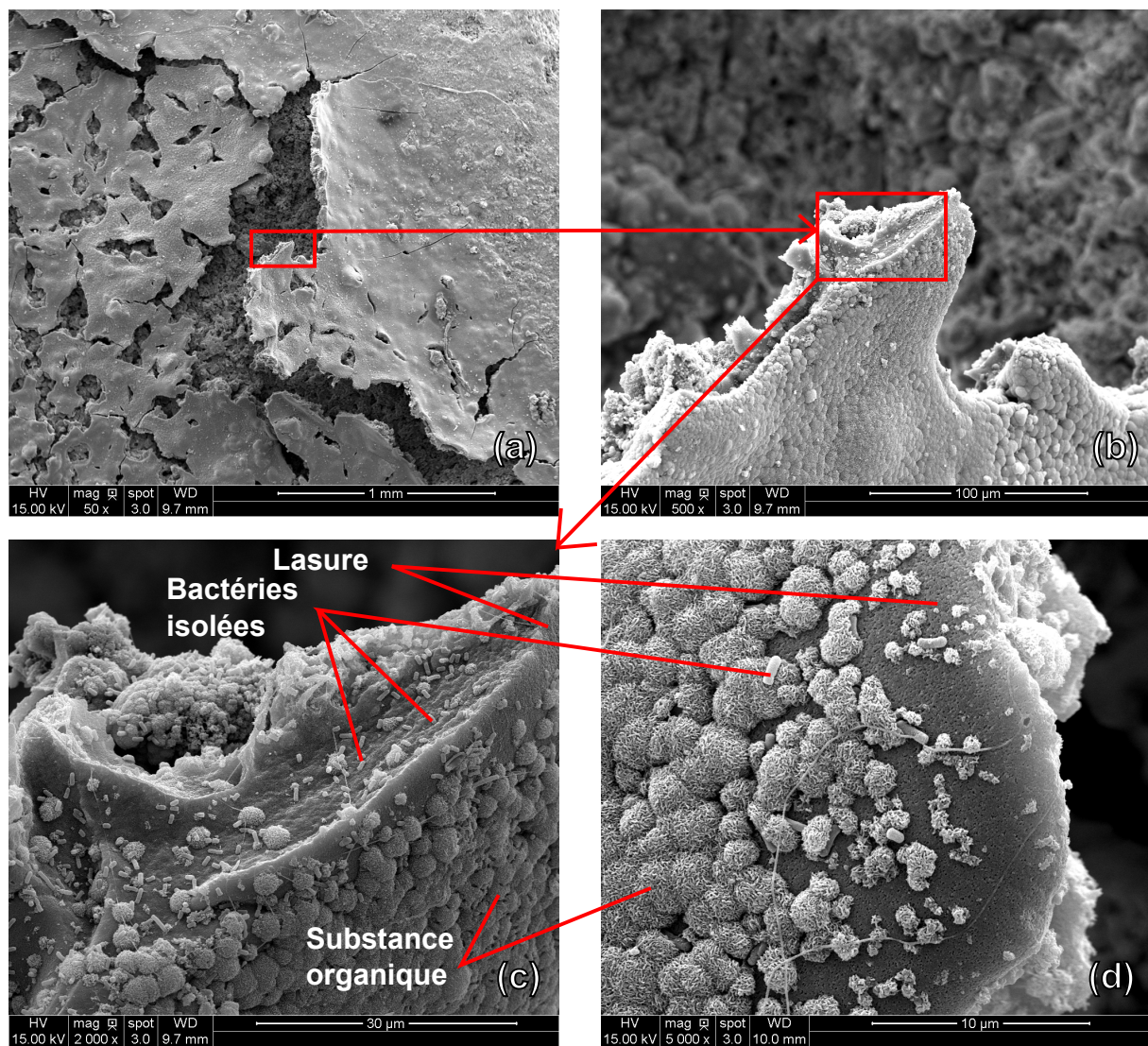


Figure 4.19 – Clichés MEB (mode SE) d'un échantillon recouvert de LP_{dis} et exposé aux UV pendant 24h d'essai. Les agrandissements, x50 (a), x500 (b), x2000 (c) et x5000 (d), permettent d'observer une substance bactérienne colonisant la lasure.

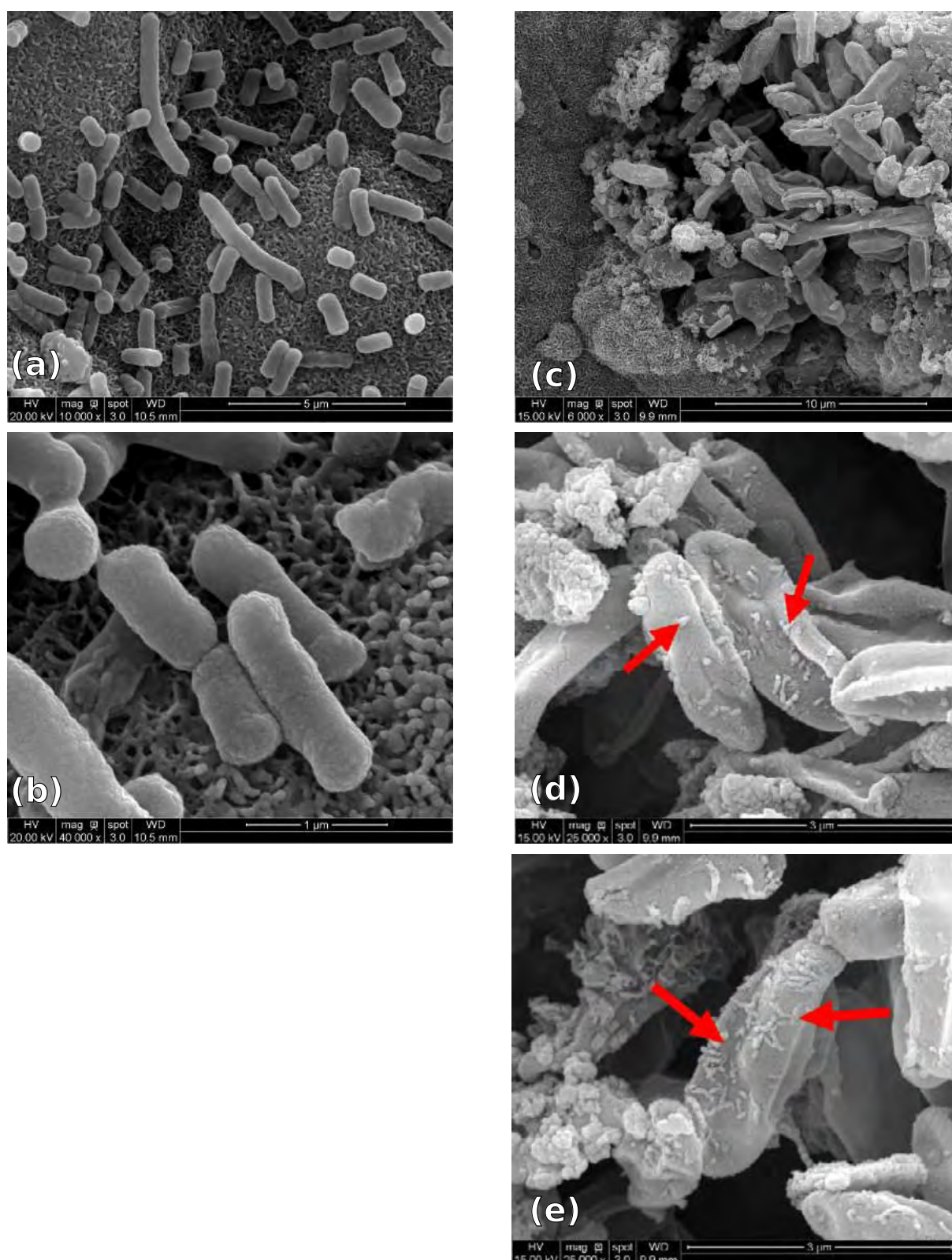


Figure 4.20 – Clichés MEB (mode SE) de cellules intactes, retrouvées sur la lasure témoin (sans photocatalyseur) maintenue dans le noir, (a) et (b). Les clichés (c), (d) et (e) montrent des cellules bactériennes mortes à la surface d'un échantillon recouvert de lasure LP_{dis} et exposé aux UV pendant 24h. Les flèches rouges indiquent des potentiels agrégats de particules de TiO_2 .

Les lasures testées dans cette partie ont montré des propriétés antimicrobiennes significatives en termes d'activité antimicrobienne sous faible irradiation lumineuse.

L'évaluation quantitative menée au cours des essais de formation de biofilm a également montré un effet entraînant une diminution du nombre d'UFC après 24h de test. En outre, Le couplage des méthodes d'analyse par culture et par observations permet de mieux définir l'activité observée. Les observations réalisées par épifluorescence, couplées à la réduction des UFC/cm² (même si elle est sous-estimée) permettent en effet de conclure à une activité antibactérienne induite par photocatalyse et/ou par superhydrophilicité.

Des analyses complémentaires doivent être menées sur la formulation des lasures, la répartition du titane et l'application des revêtements sur matériaux de construction. D'autres travaux devraient également être menés afin de définir (i) l'évaluation des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis d'autres types de micro-organismes (spores, fungi, etc.) et (ii) l'action de particules de TiO₂ dopées pour être activables par une irradiation de lumière visible.

4.3 Produits bio-sourcés à base d'esters de glycérol

L'autre solution envisagée dans le cadre de la fonctionnalisation des matériaux de construction est l'utilisation d'une molécule bio-sourcée d'ester de glycérol comme revêtement de surface. Dans cette étude, il s'agit de monoglycérides (MG). Leur stabilité en milieu cimentaire fait notamment d'eux des bons candidats pour une large gamme de matériaux de construction.

Par ailleurs, les propriétés antimicrobiennes de cette famille de molécules ont été soulignées dans la littérature (Valentin *et al.*, 2012). En effet, les monoglycérides sont des esters, qui possèdent des doubles liaisons et une chaîne carbonée de longueur moyenne, trois caractéristiques qui ont été retrouvées chez des molécules avec une activité antimicrobienne notable (Doležalová *et al.*, 2010; Isaacs *et al.*, 1995; Thormar *et al.*, 1987). Ces molécules sont également utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme agent de texture.

L'intérêt des essais développés dans cette partie réside dans l'exploration des performances d'un produit qui n'a jamais été testé comme produit antimicrobien pour les matériaux de construction. L'objectif est notamment de cibler la gamme d'efficacité et d'observer ses caractéristiques antimicrobiennes en tant que revêtement.

Plusieurs types d'essais ont donc été réalisés avec des MG dilués à différents pourcentages dans de l'eau distillée stérile. Deux tests concernent les propriétés bactéricides et bactériostatiques :

- un essai de bactéricidie en milieu aqueux (MG dilué à 20%), adaptée de (NF EN 1040, 2006) et dont le principe repose sur le contact entre un produit chimique désinfectant et une suspension bactérienne de concentration connue pendant un temps défini,
- un essai d'activité antibactérienne selon la norme JIS Z 2801 (2010) (MG dilué à 1% et 5%), dont le principe est basé sur le contact entre un inoculum et une surface antibactérienne pendant 24h.

Dans un deuxième temps, un essai de résistance à la colonisation microbienne a été mené sur des échantillons de placoplâtre recouverts d'une solution de MG diluée.

4.3.1 Propriétés antibactériennes

4.3.1.1 Évaluation de l'efficacité bactéricide selon la norme NF EN 1040

Une suspension bactérienne test a été préparée avec des cellules de *E. coli* dans de l'eau distillée et ajustée entre $1,5 \times 10^8$ et 5×10^8 UFC/ml. Une suspension de validation a été préparée de la même manière et diluée pour obtenir une concentration autour de $1,5 \times 10^3$ UFC/ml. Le MG a été dilué dans de l'eau distillée stérile de façon à obtenir une concentration massique pour le test de 20%.

Au total 6 essais ont été réalisés. Deux essais ont été écartés car un ou plusieurs témoins ne remplissaient pas les conditions de validation. Les résultats sont présentés sur le tableau 4.2 et sur la figure 4.21. Il s'agit donc de la moyenne de 4 essais avec les erreurs standards correspondantes.

Les nombres d'UFC retrouvées sur les témoins *A*, *B* et *C* sont bien supérieurs à la moitié du nombre d'UFC retrouvées sur la suspension de validation. Concernant l'efficacité bactéricide, les résultats montrent une réduction de $1,81 \pm 0,37$ log ($p < 0,010$) en 5 minutes de contact et $3,81 \pm 0,34$ log ($p < 0,001$) en 15 minutes de contact.

	5min	15min
N_0	$7,26 \pm 0,04$	—
N_a	$5,46 \pm 0,40$	$3,46 \pm 0,37$
N_{v0}	$1,66 \pm 0,05$	—
<i>A</i>	$1,66 \pm 0,04$	$1,66 \pm 0,04$
<i>B</i>	$1,68 \pm 0,03$	$1,68 \pm 0,03$
<i>C</i>	$1,46 \pm 0,04$	$1,47 \pm 0,06$

Tableau 4.2 – Nombre d'UFC retrouvées dans les différents échantillons (log10). Moyenne \pm es, n=4 (essais indépendants)

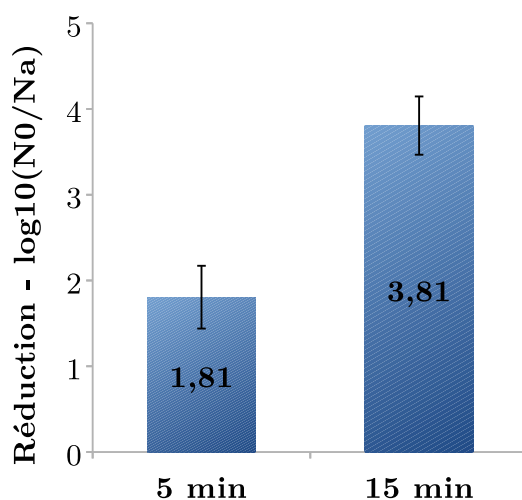


Figure 4.21 – Effet bactéricide du MG, calculé à partir des résultats du tableau 4.2 : $\log(N_0/N_a)$. Moyenne \pm es, n=4 (essais indépendants).

L'efficacité antimicrobienne des esters de glycérol est avérée et les mécanismes d'action, bien

qu'encore non élucidés, sont principalement attribués à une action sur la membrane cellulaire, comme cela a également été observé pour certains tensioactifs (Campanac *et al.*, 2002). A notre connaissance, les études sur l'efficacité antimicrobienne de ces molécules sont généralement menées en milieux aqueux. Dans la perspective de développer des revêtements pour les matériaux de construction, nous avons par la suite orienté nos méthodes d'évaluation afin de tester l'efficacité du MG en tant que support solide.

4.3.1.2 Activité antibactérienne selon la norme JIS

La méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne du MG en tant que support est identique à la méthode précédemment décrite et utilisée pour évaluer les propriétés antibactériennes des particules de TiO_2 dans le chapitre 3 et des lasures photocatalytiques dans ce chapitre. Elle est basée sur la norme JIS Z 2801 (2010). Quelques ajustements ont été réalisés pour adapter le protocole au produit.

Des membranes en polycarbonate ont été recouvertes avec 0,5 ml de solutions de MG, dosées à 5% ou 1% dans de l'eau distillée. Les échantillons ainsi recouverts ont été déposés dans des boîtes de Petri et placés sous hotte à flux laminaire pour séchage à l'air ambiant pendant 24h. La surface des échantillons était égale à la surface de la membrane : $17,3 \text{ cm}^2$.

Pour le test, les échantillons ont été inoculés avec 400 μl d'une suspension de *E. coli*, à $2,5 \times 10^5$ UFC/ml. En raison du caractère très hydrophile du matériau, il n'a pas été nécessaire d'appliquer un film sur l'inoculum. Les boîtes de Petri ont ensuite été placées dans une boîte hermétique et incubés à 30°C , 90% HR. L'hygrométrie a été maintenue avec un récipient contenant une solution sursaturée de KNO_3 . Le schéma du dispositif est présenté sur la Figure 4.22.

Après 24h de test, les échantillons ont été lavés à l'aide de 10 ml de bouillon SCDLP puis dilués en série au 10^6 . $2 \times 1 \text{ ml}$ de chaque dilution ont été filtrés sur membrane en polycarbonate dans de l'eau distillée stérile. Les membranes ont ensuite été déposées sur gélose TS. Les boîtes ont été incubées à 36°C pendant 48h avant lecture.

Un essai a été réalisé avec 3 échantillons par concentration. Une validation de la méthode de neutralisation/filtration a été réalisée pour chaque essai avec 3 échantillons de MG et 3 témoins à $t=0\text{h}$.

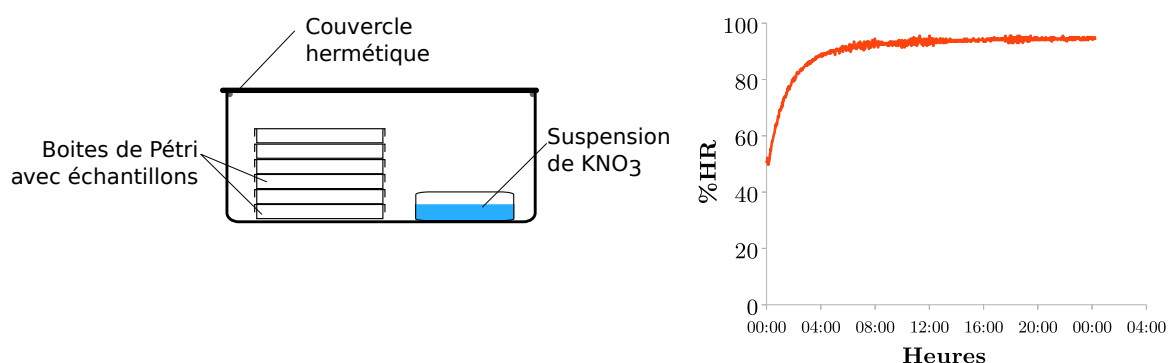


Figure 4.22 – A gauche : schéma du dispositif de l'essai en boîte de Petri, permettant le maintien des conditions hygrométriques ($\approx 90\%HR$), à droite : Courbe de l'humidité relative maintenue au cours de l'essai.

La Figure 4.23 présente les nombres de bactéries retrouvées sur les échantillons à $t=0h$ et $t=24h$ de test.

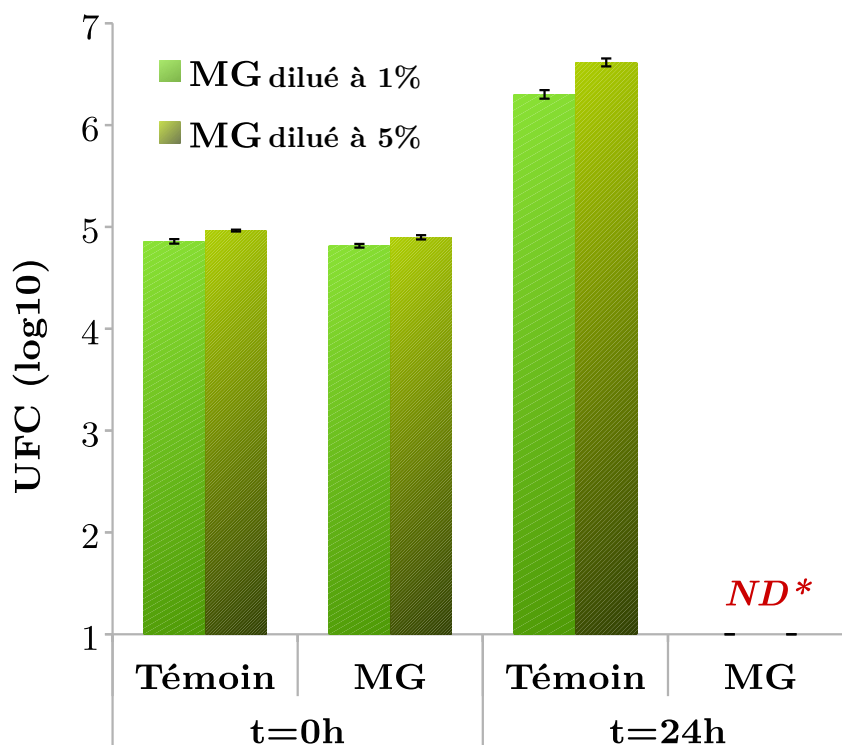


Figure 4.23 – Nombre d'UFC (log10) retrouvées après 24h de contact avec de MG testé. Moyenne \pm e.s., $n=3$. ND* : Non détectée, aucune UFC n'a été trouvée après 24h pour la dilution la plus faible (10^{-1}).

Les nombres de bactéries retrouvées sur témoin (membrane en polycarbonate seule) et sur le MG (membrane en polycarbonate recouverte de MG) après quelques secondes de contact ($t=0h$) sont semblables pour les deux expériences. La méthode de filtration/neutralisation est donc validée. Concernant les résultats à 24h, les témoins affichent des taux de $6,30 \pm 0,04 \log$ et $6,61 \pm 0,04 \log$ pour les deux essais, soit des croissances d'environ $1,5 \log$ ($p < 0,001$) par rapport à $t=0h$.

En revanche, aucune colonie n'a été détectée sur les échantillons de MG à 1% et 5% (limite de détection à 1 logarithme). Les activités anti-bactériennes correspondantes peuvent donc être calculées pour les deux concentrations en MG, en considérant : $A_{5\%} \geq 5,30 \pm 0,04 \log$ et $A_{1\%} \geq 5,62 \pm 0,04 \log$ ($p < 0,001$ dans les deux cas).

Ces résultats sont en cohérence avec les essais de bactéricidie précédents. Le monoglycéride, utilisé à une concentration de 1%, est très actif en 24h de contact avec *E. coli*, avec une réduction totale de la population déposée. Lors de l'inoculation des échantillons, le dépôt d'une goutte sur le MG a en partie entraîné sa dissolution et son retour en suspension. L'effet mesuré dans cette expérience reste donc le résultat de mécanismes d'action intervenant en milieu aqueux. Ainsi, un autre test a été réalisé, en utilisant des matériaux de construction recouverts de MG, afin d'en tester la résistance à la prolifération fongique.

4.3.2 Prolifération par contamination "naturelle"

L'objectif de cet essai était d'évaluer la résistance à la contamination et à la colonisation naturelle de matériaux de construction recouverts de MG.

La figure 4.24 présente les pourcentages de surface colonisée obtenus par analyse d'images. En moyenne, le pourcentage de surface colonisée des échantillons recouverts de MG est de 2,6%, 10,6% et 16,6% après 8, 10 et 14 semaines, respectivement. Les échantillons témoins (non recouverts) présentent des surfaces colonisées d'environ 67,6%, 80,1% et 91,1% après 8, 10 et 14 semaines d'essai.

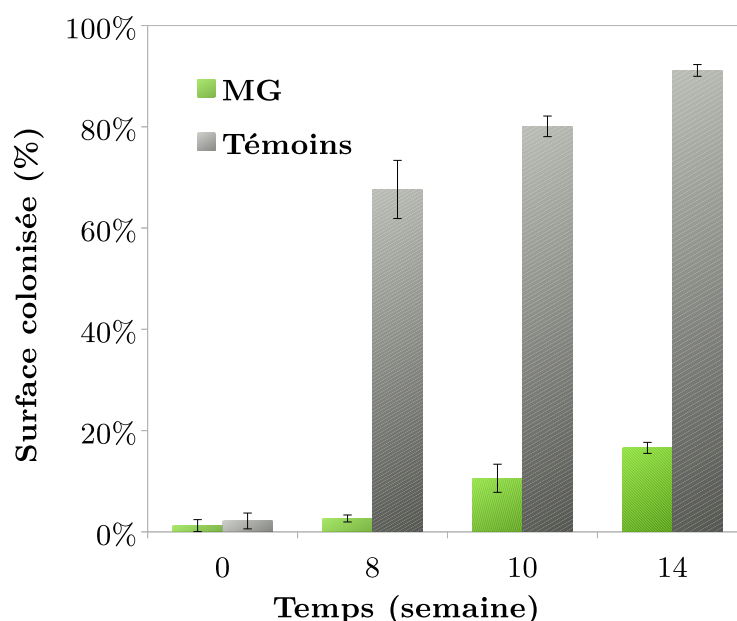


Figure 4.24 – Pourcentage de surface colonisée des échantillons en fonction du temps d'incubation, calculée à partir de l'analyse d'image. Moyenne \pm es, $n = 3$.

Les faciès de colonisation, à partir desquels les pourcentages de surfaces colonisées ont été calculés, sont présentés sur la figure 4.25. On peut observer les 6 échantillons après 0, 8 et 14 semaines de test.

Les échantillons témoins présentent tous des traces de contaminations sombres, caractéristiques de prolifération microbiologique, réparties sur l'ensemble de leur surface. En revanche les échantillons recouverts de MG sont restés relativement intacts, mis à part quelques tâches noires en bordure d'échantillons. Une fois initialisée à certains endroits, les "tâches" se répandent sur les échantillons. On peut supposer que l'apparition de la colonisation en bordure des échantillons est due à une mauvaise répartition du MG sur les bords des échantillons lors de l'application ou à un début de perte d'efficacité après un certain temps.

Prolonger les essais sur quelques semaines de plus permettrait certainement de répondre à cette hypothèse.

Une autre explication peut être la contamination par capillarité depuis la sous-face des échantillons. En effet, les sous-faces ainsi que les tranches des échantillons recouverts de MG présentaient également de grandes traces noires représentatives d'une colonisation microbienne.

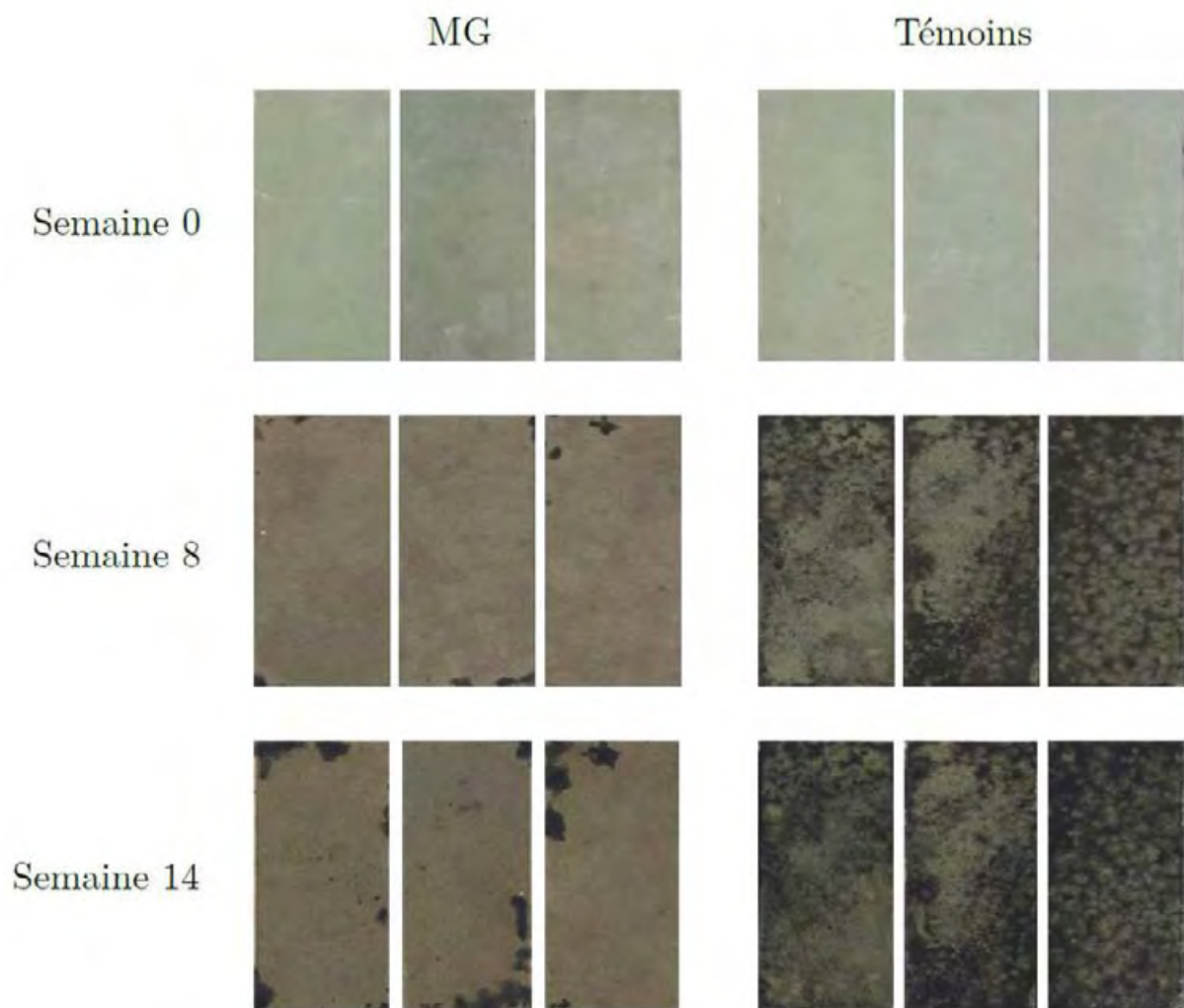


Figure 4.25 – Photographies des échantillons de placo colonisés après 0, 8 et 14 semaines de stockage en chambre humide (100%HR).

Ces observations témoignent incontestablement des propriétés antimicrobiennes du MG, utilisé en tant que revêtement pour matériaux de construction. A ce stade, les mécanismes d'action peuvent difficilement être appréhendés. La littérature souligne l'activité antimicrobienne directe de ce type de molécule par une altération de la membrane des micro-organismes, probablement induite par les propriétés tensioactives de ce type de molécule. On peut supposer que les molécules constituant le MG agissent de manière similaire sur support.

Cette étude préliminaire sur les propriétés antimicrobiennes du MG a montré une activité bactéricide puissante et une action limitant la prolifération naturelle sur matériaux de construction. Ces résultats valorisent l'utilisation de ce type de matériaux, synthétisé à partir de produits et de sous-produits de l'industrie agro-alimentaire, et encourage de nouvelles expérimentations. Plusieurs points seraient notamment intéressants à développer :

- (a) la tenue du revêtement sur différents types de support (mortier, plâtre, papier-peint...),
- (b) les interactions avec l'eau lors d'événements mouillants les surfaces,
- (c) le comportement hygroscopique d'échantillons totalement recouverts (perte/gain de masse en chambre humide, etc.),
- (d) l'efficacité antimicrobienne lorsque le MG est mélangé à un agent d'accroche tel que l'acrylique.

4.4 Conclusion

Ce chapitre a exploré le potentiel de revêtements de type lasure en tant que protection pour les matériaux de construction vis-à-vis de la contamination et de la prolifération microbienne. Les différents types d'essais menés ont permis une évaluation sur plusieurs niveaux, soulignant les possibilités de tels revêtements et les problématiques associées.

L'affinité avec l'eau a été étudiée au travers du caractère hydrophile de la lasure photocatalytique selon la période d'exposition aux UV. Les mesures d'angle de contact avec l'eau ont été menées par la méthode de la goutte sessile. Les résultats ont montré un caractère superhydrophile de la lasure accentué en fonction du temps d'irradiation préalable (pré-vieillissement). L'influence des matériaux support a également été mise en avant. Une série d'observations a notamment permis de conclure sur la présence de défauts et d'une répartition non optimale de la lasure sur les matériaux cimentaires.

Les propriétés antimicrobiennes ont été abordées à travers deux types d'essais : l'activité antibactérienne et la résistance à la formation de biofilms. Une première lasure, formulée avec des silicates pour l'accroche dans le temps, a montré des activités antibactériennes semblables dans le noir et sous irradiation lumineuse. L'effet bactéricide du pH alcalin induit par les silicates est impliqué. La lasure photocatalytique sans silicate a montré des efficacités beaucoup plus faibles, probablement limitées par l'inclusion des particules dans la matrice d'acrylique. La lasure a présenté des effets notables sur l'abatement de NOx et NO en dépollution aérienne. Il a en outre été souligné que le pré-vieillissement des lasures par une irradiation aux UV préalablement aux essais conduisait à une augmentation significative de l'efficacité antimicrobienne. La possible

libération des particules de la lasure par l'action photocatalytique sur la matrice liante a été suggérée. Cette hypothèse souligne également le risque potentiel de relargage des particules de TiO_2 dans l'environnement après un certains temps d'activation.

Un protocole expérimental innovant a été mis en œuvre pour les matériaux de construction. Il permet l'évaluation de la résistance à la formation de biofilms ou l'évaluation de la prolifération microbienne au moyen de deux méthodes d'analyses complémentaires : le dénombrement des UFC, une méthode quantitative par culture, et des observations par épifluorescence, pouvant être adaptées pour une analyse qualitative ou semi-quantitative (par mesure du pourcentage de surface colonisée).

Les résultats d'essais sur la lasure développée ont montré une certaine efficacité après 24h de test. Malgré une répartition non régulière sur matériau cimentaire, qui ne permet pas encore une protection optimale, son activité antibactérienne a été avérée. D'autres études, notamment sur l'accroche, la tenue et la répartition du revêtement sur matériaux doivent être menées, en jouant sur les différents teneurs des constituants (acrylique / silicates / dispersion de TiO_2), au travers d'essais d'abrasion par exemple. Ces types d'essai, complétés par des observations microscopiques, sont nécessaires pour améliorer le caractère protecteur vis-à-vis de la prolifération microbienne.

La dernière partie de ce chapitre correspond à une étude préliminaire sur le potentiel de molécules d'esters de glycérol bio-sourcées comme agents antimicrobiens pour matériaux de construction. Les essais réalisés ont montré des résultats très encourageants sur l'activité antimicrobienne (inhibition de croissance et bactéricidie) du MG, soulignant l'intérêt de valoriser ce produits et d'en poursuivre l'étude.

Conclusion et perspectives

La prolifération des micro-organismes dans l'environnement intérieur contribue à la dégradation de la qualité de l'air et à l'émergence de risques pour la santé des usagers, tels que le Syndrome du Bâtiment Malsain. Par ailleurs, les surfaces des matériaux de construction à l'intérieur des bâtiments peuvent, en conditions favorables, devenir des cibles importantes de colonisation microbienne. Ces conditions sont aisément satisfaites dans de nombreux bâtiments (mal isolés, mal ventilés, non étanches, ayant subi des dégâts des eaux...).

La problématique de dégradation de la qualité de l'air intérieur conduit à chercher des solutions innovantes, efficaces et simples à mettre en œuvre pour limiter la prolifération des micro-organismes à la surface des matériaux de construction. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation des matériaux de construction par le biais de revêtements antimicrobiens de type *lasure*.

Deux types de technologies ont été exploités : (i) la photocatalyse, dont le principe repose sur l'irradiation d'un photocatalyseur, dans notre cas des particules de TiO_2 , entraînant la formation d'espèces réactives capables de dégrader la matière organique dans un environnement proche et (ii) les propriétés antimicrobiennes naturelles de monoglycérides bio-sourcés. Ainsi, des *lasures* photocatalytiques et des revêtements à base d'esters de glycérol ont été développés dans le but d'être appliqués directement sur les matériaux de construction de l'environnement intérieur et de leur conférer une protection contre la contamination et/ou désinfectante. Leurs performances antimicrobiennes et les modes d'action ont été étudiés en mettant en œuvre plusieurs méthodologies d'évaluation, développées et adaptées de protocoles standardisés existants.

La première partie de l'étude bibliographique visait à poser les bases du contexte de la dégradation de l'air intérieur par des polluants d'origine biologique. La littérature montre que les matériaux de construction de l'environnement intérieur peuvent facilement devenir des cibles et des sources de prolifération microbienne. Parmi les facteurs prépondérants de la croissance microbienne intrinsèques aux matériaux de construction, on peut citer l'activité de l'eau, le pH, la composition chimique et les propriétés de surface.

Les études traitant de la contamination microbienne des surfaces intérieures renseignent par ailleurs sur plusieurs espèces qui sont fréquemment identifiées dans les environnements intérieurs humides. Les informations sur les corrélations matériaux/micro-organismes sont toutefois peu abondantes. Ce manque d'information pourrait être expliqué en partie par l'hétérogénéité des résultats d'études, soulignée par de nombreux auteurs, et par le manque d'un consensus clair sur les méthodologies d'investigation.

Pour répondre à cette problématique de colonisation microbienne à la surface des matériaux, la photocatalyse est présentée comme une solution envisageable. Il s'agit d'un procédé dépolluant

simple et qui ne nécessite pas de source d'énergie spécifique. Son principe repose sur la photogénération d'espèces oxydantes réactives agissant sur une large gamme de polluants, en phase aérienne (COV, NOx,...) ou en phase aqueuse (composés organiques, micro-organismes, ...). Les réactions photocatalytiques du TiO₂ sont normalement activées par une lumière UV. Il existe deux technologies de photocatalyseurs : le TiO₂ anatase, activable en UV et des photocatalyseurs dopés afin d'élargir le spectre de longueurs d'ondes d'activation vers le domaine du visible. Ces photocatalyseurs font encore l'objet de développement en recherche.

En outre, les taux de réduction microbienne présentés avec du TiO₂ sont souvent très élevés mais la plupart des travaux porte sur des dispositifs de laboratoire, dans lesquels les paramètres expérimentaux sont optimisés pour obtenir les rendements les plus élevés. Il n'existe que peu d'études traitant de l'efficacité du processus sous forme de produits directement et facilement applicables sur matériaux, en conditions réelles ou s'en rapprochant. Par ailleurs, les paramètres méthodologiques relatifs à l'irradiation, la mise en place du photocatalyseur et la présence d'éléments étrangers ont une influence considérable sur les taux de désinfection photocatalytique. Ce sont des facteurs extrinsèques au processus dont l'importance doit être soulignée.

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif de mettre en exergue les paramètres impactant l'efficacité d'un photocatalyseur utilisé seul et d'appréhender les enjeux et les limites de son inclusion dans une lasure de formulation relativement simple à base d'eau et d'un mélange acrylique/silicate comme liant.

Pour cette première étude sur le sujet au sein du LMDC, des photocatalyseurs activables en UV, connus pour être efficaces, ont été utilisés. Les autres technologies de photocatalyseurs dopés ne donnant pas de résultats satisfaisants actuellement. Afin de se rapprocher des conditions d'éclairement en environnement intérieur, une faible irradiance a été choisie pour activer les réactions photocatalytiques : 2,5 – 5 W/m².

Afin d'évaluer les performances antimicrobiennes et les modes d'action des produits formulés, les méthodologies suivantes ont été principalement mises en œuvre :

1. l'évaluation de l'activité antibactérienne selon les normes JIS Z 2801 et ISO 27447,
2. l'évaluation du caractère hydrophile de surface,
3. l'évaluation de la résistance à la formation de biofilm

Ce dernier essai a été développé en recoupant deux méthodes d'analyse afin d'appréhender au mieux la prolifération microbienne sur matériaux de construction. La démarche entreprise pourrait être utilisée dans un cadre plus large tel que l'étude de la colonisation de matériaux cimentaires en temps réel.

Les premiers résultats des mesures d'activités antibactériennes sur TiO₂ dans le noir montrent l'effet d'un contact prolongé entre cellules bactériennes végétatives et particules. Deux modes d'action sont envisagés : un mode physique et un mode chimique, par production d'espèces oxydantes dans le noir. En revanche, aucun effet n'a été détecté sur les spores de *B. pumilus*, qui sont des formes plus résistantes aux agressions.

Les expériences conduites sous une irradiation lumineuse d'intensité modérée (2,5 W/m²), soulignent l'effet de la distance et de la probabilité de contact entre les particules de TiO₂ et

les cellules bactériennes. L'application d'un film transparent sur l'inoculum liquide permet de rapprocher les plans des deux entités et d'améliorer de manière significative l'efficacité de désinfection. Les résultats ont permis de mettre en évidence le rôle des espèces oxydantes proches du catalyseur et donc du contact avec celui-ci. En outre, la présence de composés de différentes natures (ions, composés organiques) dans le milieu de réaction peut perturber le processus vraisemblablement par masquage des sites actifs, par effet barrière filtrant les UV ou encore par compétition d'accès au photocatalyseur et/ou consommation des espèces oxydantes. Ces paramètres apparaissent comme fondamentaux dans l'application du processus en situation réelle, en particulier pour l'élaboration de lasures dans lesquelles les particules seront fixées dans une matrice liante.

Les essais sur lasure formulée avec des silicates ont montré des abattements bactériens dans les premières heures de contact dans le noir. Il s'avère que la présence de silicates, composants inorganiques résistants à la photocatalyse, génère un pH de surface fortement basique (environ égal à 12). À ce pH, la viabilité des bactéries est fortement compromise, ce qui offre une protection antibactérienne. Afin de découpler ces effets du processus photocatalytique, plusieurs lasures alternatives ont été formulées. Le dosage en liant ainsi que l'organisation des particules (TiO_2 sous forme pulvérulente ou en dispersion) peuvent également conduire à la neutralisation complète du processus par encapsulation ou mauvaise répartition des particules.

Afin de mettre en relation certaines propriétés surfaciques des lasures, telles que le caractère hydrophile/hydrophobe, avec l'efficacité antibactérienne par photocatalyse, des mesures d'angle de contact ont été réalisées. Les mesures ont été réalisées par la méthode de la goutte sessile, sur différents matériaux recouverts de lasure photocatalytique (LP_{dis}), sans silicate, après différentes périodes d'irradiation préalable aux UV. Les résultats ont montré un caractère superhydrophile de la lasure qui était accentué avec l'augmentation du temps de pré-vieillessement. L'influence des matériaux supports a également été mise en avant. Une série d'observations a notamment permis de conclure sur la présence de défauts et d'une répartition non optimale de la lasure sur les matériaux cimentaires.

Les évaluations d'activité antibactérienne selon la JIS Z 2801 sur les lasures sans silicates montrent des activités plus faibles que les lasures avec silicates mais néanmoins significatives, autour de 1,5 log après 4h d'irradiation. Par ailleurs, les résultats mettent en évidence la diminution de l'activité avec l'augmentation de la concentration bactérienne initiale (inoculum). Le vieillissement par une exposition préalable aux UV semble avoir un effet bénéfique, ce qui permet d'envisager une augmentation significative de l'activité antibactérienne par ce type de pré-traitement. Aucune conclusion définitive ne peut être tirée sur les mécanismes mais l'hypothèse la plus probable semble être la libération des particules encapsulées en surface par dégradation (ou minéralisation partielle) de la matrice acrylique. On peut également penser que la présence de silicates, non dégradables par photocatalyse, permettrait d'éviter le relargage d'une trop grande partie de particules.

Une démarche innovante et rapide a été entreprise pour l'évaluation de la résistance à la prolifération de biofilm sur matériaux de construction cimentaires. La combinaison de deux types d'analyses se révèle complémentaire et pertinente dans ce contexte. L'étude quantitative montre un effet significatif de la lasure sur la formation de biofilm, avec une différence de 1,29 log entre

les témoins et les échantillons recouverts de lasure, après 24h de test. L'étude qualitative par observations au microscope à épifluorescence a permis de mettre en évidence le développement préférentiel des bactéries hors de la lasure photocatalytique, en bordure de certains échantillons. Les données obtenues à partir de ces deux analyses permettent de penser que la lasure fournit bien une protection contre le développement sessile de *E. coli* et que les données quantitatives sont sous-estimées. Néanmoins, les observations au microscope électronique à balayage semble indiquer que la lasure n'empêche pas totalement le biofilm de se développer. Les clichés montrent en effet une contamination quasi-intégrale de la lasure. En revanche, les observations montrent également des groupes de bactéries endommagées, dont les parois sont parsemées d'amas de taille déci-micrométrique apparentés à des particules de TiO_2 . Ces résultats traduisent des effets localisés sur les cellules bactériennes.

D'un point de vue industriel, ce type de produit reste envisageable dans l'avenir en tant que protection des matériaux de construction contre la prolifération microbienne. La formulation incluant des silicates et des particules pourrait s'avérer d'une grande efficacité contre plusieurs types d'organismes tout en offrant une durabilité importante. Des études complémentaires sur les lasures avec silicates sont toutefois nécessaires. L'analyse de l'effet du pré-vieillessement sur l'efficacité ainsi que des mesures du taux de relargage des particules dans le temps seraient de bons moyens de s'assurer des performances de ces produits à plus ou moins longs termes. Par ailleurs, des innovations doivent être réalisées dans l'accroche et la répartition de la lasure sur support. La création d'un film homogène et avec moins de défauts surfaciques est une condition *sine qua non* de la protection contre les micro-organismes. En outre, dans une perspective d'application des lasures sur les surfaces de l'environnement intérieur, il est nécessaire de réaliser des études avec un photocatalyseur dopé efficace. Une campagne d'essais avec des lasures formulées à base de particules photocatalytiques activables par un rayonnement visible doit être envisagée dans la continuité de ces travaux. Ce genre d'étude a encore été peu mené sur les performances antimicrobiennes de photocatalyseurs dopés. Les techniques de synthèse des photocatalyseurs dopés sont nombreuses et certaines sont encore à l'étude. Néanmoins, quelques travaux ont montré des activités antibactériennes significatives pour des photocatalyseurs dopés au cuivre, au carbone (Liou et Chang, 2012; Mitoraj *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2003)...

Maintenant que les paramètres d'essai de la photocatalyse de particules de TiO_2 conventionnel ont été déterminés, il faut orienter les recherches vers ce type de produit dopé, activable par de simples éclairages d'intérieur.

Tous les essais menés dans ces travaux de thèse sont basés sur des évaluations en milieux liquides, avec des inoculums bactériens importants. Ces choix méthodologiques ont été faits afin de mieux définir l'activité antibactérienne potentielle. En conditions réelles, la présence d'eau (a_w) est limitée et la charge microbienne est considérablement plus faible. A notre connaissance, aucune étude n'a encore été réalisée sur les mécanismes de contamination des surfaces à l'intérieur des bâtiments mais la contamination biologique aéroportée est déjà reconnue. A ce titre, une campagne d'essais sur l'évaluation de l'efficacité des lasures face à une contamination par voie aérienne serait intéressante.

Par ailleurs, les essais réalisés ont essentiellement concernés *E. coli*, qui est une bactérie modèle, notamment recommandée pour évaluer l'activité antibactérienne (ISO 27447, 2009;

JIS Z 2801, 2010). Elle n'est toutefois pas représentative des espèces que l'on retrouve classiquement dans l'environnement intérieur.

Maintenant que les conditions d'essai et les paramètres d'influence de la photocatalyse ont été définis, il faudrait compléter les recherches par une étude sur un spectre de micro-organismes plus large, incluant notamment des moisissures, telles que des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, etc. et des spores bactériennes.

Finalement, ces travaux ont permis de mettre en avant l'action intrinsèque des particules de TiO_2 dans le noir. Ils ont en outre mis en avant l'activité antibactérienne des particules illuminées par une source de lumière UV de faible irradiance, gouvernée par un certain nombre de facteurs méthodologiques. Les lasures formulées à base de particules photocatalytiques ont également montré des activités antibactériennes significatives.

Ces résultats sont très prometteurs vis-à-vis de l'utilisation de cette technologie pour lutter contre la prolifération microbienne sur les matériaux de construction.

Un effet significatif a également été détecté sur la formation de biofilm, en conditions d'essai, c'est-à-dire avec une charge bactérienne relativement élevée. Il serait intéressant de réaliser une série d'essais en conditions réelles, dans lesquelles la charge d'inoculation est très inférieure. Il serait alors possible d'observer si les revêtements procurent aux matériaux de construction une protection contre la contamination et, secondairement, la prolifération microbienne.

Concernant le travail exploratoire sur les monoglycérides, la dernière partie de l'étude bibliographique traitait du potentiel antimicrobien d'acides gras et de leurs esters. L'efficacité de désinfection de ce type de molécules sur divers micro-organismes a été détaillée. Le mode d'action des molécules, quant à lui, est encore mal connu. Néanmoins, il semble dépendre de la longueur de la chaîne carbonée et de la présence de doubles liaisons dans cette chaîne. Les monoglycérides, molécules bio-sourcées qui sont des esters de glycérol issus de sous-produits de l'agro-industrie, sont également envisagées comme une solution au problème de prolifération sur les matériaux de construction, en tant que constituants de revêtements antimicrobiens.

Les résultats des essais sur les monoglycérides affichent des propriétés antibactériennes puissantes : plusieurs logarithmes d'inactivation en quelques minutes de contact seulement. Un effet bactéricide a été identifié et, une fois appliqués sur matériaux, les MG montrent des signes importants de protection contre la prolifération microbienne. Un effet sur la membrane des micro-organismes est envisagé. Ce travail reste une étude préliminaire et de nombreuses perspectives sont envisageables pour ce produit particulier. En outre, du fait de sa solubilisation dans l'eau, des essais de tenue sur matériaux doivent être réalisés afin de s'assurer que les MG sur support ne retournent pas en solution une fois mouillés. Dans ce sens, il serait intéressant d'étudier leurs propriétés après inclusion dans une lasure, qui offre une certaine durabilité, ou directement greffés en surface. D'autres essais doivent également être menés sur différents matériaux et avec différents organismes. Du point de vue des mécanismes d'action, des observations au microscope optique couplées à une spectroscopie RAMAN permettraient d'identifier le spectre des molécules et d'observer leur comportement lorsqu'elles sont en contact avec une paroi bactérienne. Des observations complémentaires pourraient être réalisées au microscope à transmission, à une échelle plus réduite, afin de visualiser les dégâts induits au niveau cellulaire.

Bibliographie

- [1] **Abdullah M., Low G. K. C., et Matthews R. W..** Effects of common inorganic anions on rates of photocatalytic oxidation of organic carbon over illuminated titanium dioxide. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(17):6820–6825, août 1990.
- [2] **Adams L. K., Lyon D. Y., et Alvarez P. J..** Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40(19):3527–3532, nov. 2006. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135406004647>.
- [3] **Adan O. C. G..** *On the fungal defacement of interior finishes*. Thèse de doctorat, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, 1994.
- [4] **Agustina T., Ang H., et Vareek V..** A review of synergistic effect of photocatalysis and ozonation on wastewater treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology C : Photochemistry Reviews*, 6(4):264–273, 2005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389556706000050>.
- [5] **Alasri A., Roques C., Michel G., Cabassud C., et Aptel P..** Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(7):635–642, 1992. URL <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m92-104>.
- [6] **Allen N. S., Edge M., Sandoval G., Verran J., Stratton J., et Maltby J..** Photocatalytic coatings for environmental applications¶†. *Photochemistry and Photobiology*, 81(2):279–290, 2005. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2005.tb00185.x>.
- [7] **Allen N. S., Edge M., Verran J., Stratton J., Maltby J., et Bygott C..** Photocatalytic titania based surfaces : Environmental benefits. *Polymer Degradation and Stability*, 93(9):1632 – 1646, 2008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391008001821>.
- [8] **Allion A..** *Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d’une technique rapide pour déterminer in situ l’efficacité bactéricide d’agents antimicrobiens*. Thèse de doctorat, ENSIA (AgroParisTech), juin 2004. URL <http://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00003703>.
- [9] **Almquist C. B. et Biswas P..** Role of synthesis method and particle size of nanostructured TiO₂ on its photoactivity. *Journal of Catalysis*, 212(2):145–156, déc. 2002. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021951702937838>.
- [10] **Andersen B., Frisvad J. C., Søndergaard I., Rasmussen I. S., et Larsen L. S..** Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12):4180–4188, juin 2011. URL <http://aem.asm.org/content/77/12/4180>.

- [11] **Andersen B., Nielsen K. F., et Jarvis B. B.** Characterization of stachybotrys from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia*, 94(3):392–403, mai 2002. URL <http://www.mycologia.org/content/94/3/392>.
- [12] **Andersson M. A., Nikulin M., Kõljalg U., Andersson M. C., Rainey F., Reijula K., Hintikka E. L., et Salkinoja-Salonen M.** Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2):387–393, fév. 1997. URL <http://aem.asm.org/content/63/2/387>.
- [13] **ASEF** . Pollution de l’air intérieur de l’habitat. Association Santé Environnement France, Mars 2012. URL http://www.asef-asso.fr/attachments/1141_Guide_air%20int%C3%A9rieur.pdf.
- [14] **ASTM D 3273** . Standard test method for resistance to growth of mold on surface of interior coating in an environmental chamber, 2012.
- [15] **ASTM D 6329** . Standard guide for developing methodology for evaluating the ability of indoor materials to support microbial growth using static environmental chambers, jan. 1998. URL <http://www.astm.org/Standards/D6329.htm>.
- [16] **Ayerst G.** The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research*, 5(2):127–141, 1969. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022474X69900551>.
- [17] **Baldry M.** The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3):417–423, 1983.
- [18] **Beckett A., Read N. D., et Porter R.** Variations in fungal spore dimensions in relation to preparatory techniques for light microscopy and scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 136(1):87–95, 1984. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2818.1984.tb02548.x/abstract>.
- [19] **Beckett A. et Read N. D.** Low-temperature scanning electron microscopy. In **Aldrich H. C. et Todd W. J.**, eds : *Ultrastructure Techniques for Microorganisms*, p. 45–86. Springer US, 1986. ISBN 978-1-4684-5121-4, 978-1-4684-5119-1. URL http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-5119-1_2.
- [20] **Beguin H. et Nolard N.** Mould biodiversity in homes i. air and surface analysis of 130 dwellings. *Aerobiologia*, 10(2-3):157–166, déc. 1994. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02459231>.
- [21] **Bellanger A.-P., Reboux G., Roussel S., Grenouillet F., Didier-Scherer E., Dalphin J.-C., et Millon L.** Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 49(2):260–266, 2009. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2009.02653.x/abstract>.
- [22] **Benabbou A., Derriche Z., Felix C., Lejeune P., et Guillard C.** Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* : Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B : Environmental*, 76(3–4):257–263, nov. 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092633730700166X>.
- [23] **Bergsson G., Arnfinnsson J., Karlsson S. M., Steingrímsson O., et Thormar H.** In Vitro Inactivation of *Chlamydia trachomatis* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9):2290–2294, sept. 1998. URL <http://aac.asm.org/content/42/9/2290>.

- [24] **Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrímsson O., et Thormar H.** Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS*, 109(10):670–678, oct. 2001. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0463.2001.d01-131.x/abstract>.
- [25] **Bergsson G., Steingrímsson O., et Thormar H.** Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on helicobacter pylori. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20(4):258–262, oct. 2002. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857902002054>.
- [26] **Besnard V.** *L'état viable non cultivable d'un pathogène d'intérêt majeur en hygiène des aliments : Listeria monocytogenes. Etude de la physiologie, des conditions de retour à l'état cultivable et de la virulence.* Microbiologie, Faculté des Sciences et Technologies de Nantes, Nantes, 2002.
- [27] **Beydoun D., Amal R., Low G., et McEvoy S.** Role of nanoparticles in photocatalysis. *Journal of Nanoparticle Research*, 1(4):439–458, déc. 1999. URL <http://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1010044830871>.
- [28] **Bhatkhande D. S., Pangarkar V. G., et Beenackers A. A. C. M.** Photocatalytic degradation for environmental applications – a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 77(1):102–116, 2002. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.532/abstract>.
- [29] **Bideau M., Claudel B., Dubien C., Faure L., et Kazouan H.** On the “immobilization” of titanium dioxide in the photocatalytic oxidation of spent waters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 91(2):137–144, oct. 1995. URL <https://www-sciencedirect-com.docadis.ups-tlse.fr/science/article/pii/101060309504098Z>.
- [30] **Bjurman J.** Ergosterol as an indicator of mould growth on wood in relation to culture age, humidity stress and nutrient level. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 33(4):355–368, 1994. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0964830594900132>.
- [31] **Black C. et Straube J.** Mould growth experiments of full scale wood frame wall assemblies. *In 11th Canadian Conference on Building Science and Technology, Banff, Calgary*, Banff, Calgary, 2007.
- [32] **Blöß S. P. et Elfenthal L.** Doped titanium dioxide as a photocatalyst for UV and visible light. *In Proceedings International RILEM Symposium on Photocatalysis, Environment and Construction Materials TDP, Florence, Italy*, p. 31–38. P. Baglioni and L. Cassar, 2007.
- [33] **Bougoure J. J., Bougoure D. S., Cairney J. W., et Dearnaley J. D.** ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from acianthus, caladenia and pterostylis (orchidaceae) in southeastern queensland. *Mycological Research*, 109(4):452–460, avr. 2005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756208614380>.
- [34] **Bouillard L., Michel O., Dramaix M., et Devleeschouwer M.** Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12(2):187–192, 2005.
- [35] **Boutin-Forzano S., Charpin-Kadouch C., Chabbi S., Bennedjai N., Dumon H., et Charpin D.** Wall relative humidity : a simple and reliable index for predicting stachybotrys chartarum infestation in dwellings. *Indoor Air*, 14(3):196–199, 2004. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.2004.00233.x/abstract>.
- [36] **Brown A. D.** Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40(4):803–846, déc. 1976. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413986/>.

- [37] **Brown G. S., Betty R. G., Brockmann J. E., Lucero D. A., Souza C. A., Walsh K. S., Boucher R. M., Tezak M. S., et Wilson M. C.** Evaluation of vacuum filter sock surface sample collection method for bacillus spores from porous and non-porous surfaces. *Journal of environmental monitoring : JEM*, 9(7):666–671, juil. 2007.
- [38] **Brown G., Betty R., Brockmann J., Lucero D., Souza C., Walsh K., Boucher R., Tezak M., Wilson M., Rudolph T., Lindquist H., et Martinez K.** Evaluation of rayon swab surface sample collection method for bacillus spores from nonporous surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4):1074–1080, 2007. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03331.x/abstract>.
- [39] **Busscher H. J., Weerkamp A. H., Mei H. C. v. d., Pelt A. W. v., Jong H. P. d., et Arends J.** Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5):980–983, nov. 1984. URL <http://aem.asm.org/content/48/5/980>.
- [40] **Busscher H. J. et Weerkamp A. H.** Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Letters*, 46(2):165–173, 1987. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02457.x>.
- [41] **Buttner M. P., Cruz P., Stetzenbach L. D., et Cronin T.** Evaluation of two surface sampling methods for detection of erwinia herbicola on a variety of materials by culture and quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11):3505–3510, juin 2007. URL <http://aem.asm.org/content/73/11/3505>.
- [42] **Byrne J. A., Eggins B. R., Brown N. M. D., McKinney B., et Rouse M.** Immobilisation of TiO₂ powder for the treatment of polluted water. *Applied Catalysis B : Environmental*, 17(1–2):25–36, 1998. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092633739700101X>.
- [43] **Caballero L., Whitehead K., Allen N., et Verran J.** Inactivation of escherichia coli on immobilized TiO₂ using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 202(2–3):92–98, 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603008004735>.
- [44] **Cai R., Hashimoto K., Itoh K., Kubota Y., et Fujishima A.** Photokilling of malignant cells with ultrafine TiO₂ powder. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 64(4):1268–1273, 1991. URL <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=5548564>.
- [45] **Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Mouysset G., et Roques C.** Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5):1469–1474, mai 2002. URL <http://aac.asm.org/content/46/5/1469>.
- [46] **Carp O., Huisman C., et Reller A.** Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in Solid State Chemistry*, 32(1–2):33–177, 2004. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079678604000123>.
- [47] **Cassar L. et Pepe C.** Hydraulic binder and cement compositions containing photocatalyst particles, juin 2002. URL <http://www.google.com/patents/US6409821>.
- [48] **Chang J. C., Foarde K. K., et Vanosdell D. W.** Growth evaluation of fungi (penicillium and aspergillus spp.) on ceiling tiles. *Atmospheric Environment*, 29(17):2331–2337, sept. 1995. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1352231095000624>.

- [49] **Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.-N., et Hebraud M.** *Listeria monocytogenes* LO28 : surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2):728–737, fév. 2002.
- [50] **Chen F., Yang X., et Wu Q.** Antifungal capability of TiO₂ coated film on moist wood. *Building and Environment*, 44(5):1088–1093, mai 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360132308001856>.
- [51] **Chen J. et Poon C.-s.** Photocatalytic cementitious materials : Influence of the microstructure of cement paste on photocatalytic pollution degradation. *Environmental Science & Technology*, 43(23):8948–8952, 2009. URL <http://dx.doi.org/10.1021/es902359s>.
- [52] **Cheng Y. W., Chan R. C. Y., et Wong P. K.** Disinfection of legionella pneumophila by photocatalytic oxidation. *Water Research*, 41(4):842–852, 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135406006725>.
- [53] **Cho M. et Yoon J.** Measurement of OH radical CT for inactivating *Cryptosporidium parvum* using photo/ferrioxalate and photo/TiO₂ systems. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3):759–766, mars 2008. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03682.x/abstract>.
- [54] **Cho M., Chung H., Choi W., et Yoon J.** Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1):270–275, jan. 2005. URL <http://aem.asm.org/content/71/1/270>.
- [55] **Chong M. N., Jin B., Chow C. W. K., et Saint C.** Recent developments in photocatalytic water treatment technology : A review. *Water Research*, 44(10):2997–3027, 2010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410001739>.
- [56] **Chung C.-J., Lin H.-I., Chou C.-M., Hsieh P.-Y., Hsiao C.-H., Shi Z.-Y., et He J.-L.** Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. *Surface and Coatings Technology*, 203(8):1081–1085, jan. 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897208009663>.
- [57] **Clarke S. R., Mohamed R., Bian L., Routh A. F., Kokai-Kun J. F., Mond J. J., Tarkowski A., et Foster S. J.** The *Staphylococcus aureus* Surface Protein IsdA Mediates Resistance to Innate Defenses of Human Skin. *Cell Host & Microbe*, 1(3):199–212, 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312807000716>.
- [58] **Cooley J. D., Wong W. C., Jumper C. A., et Straus D. C.** Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occupational and Environmental Medicine*, 55(9):579–584, sept. 1998. URL <http://oem.bmj.com/content/55/9/579>.
- [59] **Coppock J. B. M. et Cookson E. D.** The effect of humidity on mould growth on constructional materials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2(12):534–537, déc. 1951. URL <https://onlinelibrary-wiley-com.docadis.ups-tlse.fr/doi/10.1002/jsfa.2740021203/abstract>.
- [60] **Corry J. E. L.** Relationships of water activity to fungal growth. In *Food and Beverage Mycology*, chap. Relationships of water activity to fungal growth, p. 51–100. Larry R. Beuchat, 1987. URL <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1988/US/US88051.xml;US881682788>.

- [61] Costerton J. W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., et James G.. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8):2137–2142, avr. 1994.
- [62] CSHPF . Groupe de travail "Moississure dans l'habitat" : Contaminations fongiques en milieux intérieurs. diagnostic, effet sur la santé respiratoire, conduite à tenir., 2006. URL http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Contaminations_fongiques_en_milieux_interieurs.pdf.
- [63] Dalod E.. *Influence de la composition chimique de mortiers sur leur biodétérioration par les algues*. Génie des Procédés, Saint-Etienne, EMSE, fév. 2015. URL <http://www.theses.fr/2015EMSE0777>.
- [64] Dalrymple O. K., Stefanakos E., Trotz M. A., et Goswami D. Y.. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Applied Catalysis B : Environmental*, 98(1–2):27–38, 2010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337310001918>.
- [65] Daoud W. A., Xin J. H., et Zhang Y.-H.. Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities. *Surface Science*, 599(1–3):69–75, 2005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039602805010927>.
- [66] Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., et Greenberg E. P.. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*, 280(5361):295–298, avr. 1998. URL <http://www.sciencemag.org/content/280/5361/295>.
- [67] De Muynck W., De Belie N., et Verstraete W.. Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1):62–72, 2010. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04395.x/abstract>.
- [68] Niederh usern S. de, Bondi M., et Bondioli F.. Self-Cleaning and Antibacteric Ceramic Tile Surface. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 10(6):949–956, nov. 2013. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7402.2012.02801.x/abstract>.
- [69] Demchick P. et Koch A. L.. The permeability of the wall fabric of escherichia coli and bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 178(3):768–773, fév. 1996. URL <http://jb.asm.org/content/178/3/768>.
- [70] Deruelle S.. Rôle du support dans la croissance des microorganismes. *Materials and Structures*, 24(3):163–168, mai 1991. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02472980>.
- [71] Desbois A. P. et Smith V. J.. Antibacterial free fatty acids : activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6):1629–1642, d c. 2009. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-2355-3>.
- [72] Diamanti M. V., Ormellese M., et Peddeferri M.. Characterization of photocatalytic and superhydrophilic properties of mortars containing titanium dioxide. *Cement and Concrete Research*, 38(11):1349–1353, nov. 2008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008884608001488>.
- [73] Dillon H. K., Miller J. D., Sorenson W. G., Douwes J., et Jacobs R. R.. Review of methods applicable to the assessment of mold exposure to children. *Environmental Health Perspectives*, 107 (Suppl 3):473–480, juin 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1566225/>.
- [74] Dole alov  M., Jani  R., Svobodov  H., Ka p rkov  V., Humpol  ek P., et Krej   J.. Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic (C11 :0) and undecenoic (C11 :1) acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(10):1106–1114, oct. 2010. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.200900295/abstract>.

- [75] **Doll S. C.**. *Determination of limiting conditions for fungal growth in the built environment*. Thèse de doctorat, Harvard School of Public Health, Harvard School, 2002.
- [76] **Dompont D., Martinez T., Bertron A., et Ringot E.**. Dépollution de l'air intérieur par photocatalyse - rapport d'avancement FUI DAIP. Rap. tech., Rapport LMDC, Université de Toulouse, 2013.
- [77] **D'Orazio M., Cursio G., Graziani L., Aquilanti L., Osimani A., Clementi F., Yéprémian C., Lariccia V., et Amoroso S.**. Effects of water absorption and surface roughness on the bioreceptivity of ETICS compared to clay bricks. *Building and Environment*, 2014. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036013231400078X>.
- [78] **Dunlop P., Byrne J., Manga N., et Eggins B.**. The photocatalytic removal of bacterial pollutants from drinking water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 148(1-3):355–363, mai 2001. URL <https://www-sciencedirect-com.docadis.ups-tlse.fr/science/article/pii/S1010603002000631>.
- [79] **Edmonds J. M., Collett P. J., Valdes E. R., Skowronski E. W., Pellar G. J., et Emanuel P. A.**. Surface sampling of spores in dry-deposition aerosols. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1):39–44, oct. 2008. URL <http://aem.asm.org/content/75/1/39>.
- [80] **Edmonds J.**. Efficient methods for large-area surface sampling of sites contaminated with pathogenic microorganisms and other hazardous agents : current state, needs, and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(5):811–816, oct. 2009. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2136-z>.
- [81] **Ehrich S., Helard L., Letourneux R., Willocq J., et Bock E.**. Biogenic and chemical sulfuric acid corrosion of mortars. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 11(4):340–344, 1999. URL <http://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/%28ASCE%290899-1561%281999%2911%3A4%28340%29>.
- [82] **Ellringer P., Boone K., et Hendrickson S.**. Building materials used in construction can affect indoor fungal levels greatly. *AIHAJ - American Industrial Hygiene Association*, 61(6):895–899, 2000. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15298660008984603>.
- [83] **EnVIE** . EnVIE co-ordination action on indoor air quality and health effects. *Publishable final activity report*. Brussels : European Commission, 2009. URL <http://www.envie-iaq.eu/>.
- [84] **Eurocae ED-14E, Section 13** . Environmental conditions and test procedures airborne equipment, fév. 2005.
- [85] **Faille C., Jullien C., Fontaine F., Bellon-Fontaine M.-N., Slomianny C., et Benezech T.**. Adhesion of bacillus spores and escherichia coli cells to inert surfaces : role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(8):728–738, 2002.
- [86] **Faure M.**. *Purification de l'air ambiant par l'action bactéricide de la photocatalyse*. Génie des procédés et des produits, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, nov. 2010.
- [87] **Fisk W. J., Lei-Gomez Q., et Mendell M. J.**. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air*, 17(4):284–296, 2007. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.2007.00475.x/abstract>.
- [88] **Fisk W. J., Eliseeva E. A., et Mendell M. J.**. Association of residential dampness and mold with respiratory tract infections and bronchitis : a meta-analysis. *Environmental Health*, 9(1):72, nov. 2010. URL <http://www.ehjournal.net/content/9/1/72/abstract>.

- [89] **Flannigan B., Samson R. A., et Miller J. D.** *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments : Diversity, Health Impacts, Investigation and Control*. Taylor & Francis Group, 2001. ISBN 9780415268004.
- [90] **Fletcher M. et Loeb G. I.** Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(1):67–72, jan. 1979. URL <http://aem.asm.org/content/37/1/67>.
- [91] **Foster H. A., Ditta I. B., Varghese S., et Steele A.** Photocatalytic disinfection using titanium dioxide : spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6):1847–1868, juin 2011. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3213-7>.
- [92] **Fox A. et Rosario R. M. T.** Quantification of muramic acid, a marker for bacterial peptidoglycan, in dust collected from hospital and home air-conditioning filters using gas chromatography — mass spectrometry. *Indoor Air*, 4(4):239–247, 1994. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.1994.00004.x/abstract>.
- [93] **Fox M. A. et Dulay M. T.** Heterogeneous photocatalysis. *Chemical Reviews*, 93(1):341–357, jan. 1993. URL <http://dx.doi.org/10.1021/cr00017a016>.
- [94] **Fujishima A., Rao T. N., et Tryk D. A.** Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C : Photochemistry Reviews*, 1(1):1–21, juin 2000. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389556700000022>.
- [95] **Fujishima A. et Zhang X.** Titanium dioxide photocatalysis : present situation and future approaches. *Comptes Rendus Chimie*, 9(5–6):750–760, 2006. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631074805003036>.
- [96] **Fung F. et Hughson W. G.** Health Effects of Indoor Fungal Bioaerosol Exposure. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 18(7):535–544, 2003. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10473220301451>.
- [97] **Galbraith H. et Miller T. B.** Effect of Long Chain Fatty Acids on Bacterial Respiration and Amino Acid Uptake. *Journal of Applied Bacteriology*, 36(4):659–675, 1973. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1973.tb04151.x/abstract>.
- [98] **Gardes M. et Bruns T. D.** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2):113–118, 1993. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x/abstract>.
- [99] **Ge Y., Schimel J. P., et Holden P. A.** Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environmental Science & Technology*, 45(4):1659–1664, 2011. URL <http://dx.doi.org/10.1021/es103040t>.
- [100] **Giannantonio D. J., Kurth J. C., Kurtis K. E., et Sobecky P. A.** Effects of concrete properties and nutrients on fungal colonization and fouling. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(3):252–259, nov. 2008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830508001789>.
- [101] **Gibson A. M., Baranyi J., Pitt J. I., Eyles M. J., et Roberts T. A.** Predicting fungal growth : the effect of water activity on aspergillus flavus and related species. *Special Issue Predictive Modelling*, 23(3–4):419–431, nov. 1994. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160594901678>.

- [102] **Gogniat G.** *Mécanismes d'action du TiO₂ illuminé sur Escherichia Coli*. Sciences et ingénierie de l'environnement, Faculté de l'environnement naturel, architectural et construit, École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Laboratoire de biotechnologie environnementale, 2006.
- [103] **Gogniat G.** et **Dukan S.** TiO₂ photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23):7740–7743, déc. 2007. URL <http://aem.asm.org/content/73/23/7740>.
- [104] **Gogniat G.**, **Thyssen M.**, **Denis M.**, **Pulgarin C.**, et **Dukan S.** The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1):18–24, 2006. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00190.x/abstract>.
- [105] **Gomes A. I.**, **Santos J. C.**, **Vilar V. J. P.**, et **Boaventura R. A. R.** Inactivation of bacteria e. coli and photodegradation of humic acids using natural sunlight. *Applied Catalysis B : Environmental*, 88(3–4):283–291, 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337308004232>.
- [106] **Górny R. L.** Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air—a review. *Ann Agric Environ Med*, 11:185–197, 2004.
- [107] **Goulhen-Chollet F.**, **Josset S.**, **Keller N.**, **Keller V.**, et **Lett M.-C.** Monitoring the bactericidal effect of UV-A photocatalysis : A first approach through 1D and 2D protein electrophoresis. *Catalysis Today*, 147(3–4):169–172, oct. 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586109003277>.
- [108] **Grant C.**, **Hunter C.**, **Flannigan B.**, et **Bravery A.** The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *International Biodeterioration*, 25(4):259–284, 1989. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/026530368990002X>.
- [109] **Gravesen S.**, **Nielsen P. A.**, **Iversen R.**, et **Nielsen K. F.** Microfungal contamination of damp buildings—examples of risk constructions and risk materials. *Environmental Health Perspectives*, 107 (Suppl 3):505, nov. 1998. URL <http://pmc/articles/PMC1566214/?report=abstract>.
- [110] **Greist H.**, **Hingorani S.**, **Kelly K.**, et **Goswami D.** Using scanning electron microscopy to visualize photocatalytic mineralization of airborne microorganisms. *Indoor Air*, 2002:9th, 2002.
- [111] **Gu J.-D.**, **Ford T. E.**, **Berke N. S.**, et **Mitchell R.** Biodeterioration of concrete by the fungus fusarium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(2):101–109, 1998. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830598000341>.
- [112] **Gumy D.**, **Morais C.**, **Bowen P.**, **Pulgarin C.**, **Giraldo S.**, **Hajdu R.**, et **Kiwi J.** Catalytic activity of commercial of TiO₂ powders for the abatement of the bacteria (e. coli) under solar simulated light : Influence of the isoelectric point. *Applied Catalysis B : Environmental*, 63(1–2):76–84, mars 2006. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337305003346>.
- [113] **Gumy D.**, **Rincon A.**, **Hajdu R.**, et **Pulgarin C.** Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of water : Different types of suspended and fixed TiO₂ catalysts study. *Solar Energy*, 80(10):1376–1381, avr. 2005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038092X05002926>.
- [114] **Gurr J.-R.**, **Wang A. S. S.**, **Chen C.-H.**, et **Jan K.-Y.** Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213(1–2):66–73, sept. 2005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X05002271>.

- [115] **Gurtner C., Heyrman J., Piñar G., Lubitz W., Swings J., et Rölleke S.** Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(3):229–239, oct. 2000. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830500000792>.
- [116] **Gutarowska B. et Żakowska Z.** Elaboration and application of mathematical model for estimation of mould contamination of some building materials based on ergosterol content determination. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49(4):299–305, juin 2002. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483050200063X>.
- [117] **Gutarowska B.** Disasters, accidents and microbiological threats in industry and building (in polish). *Publishing House of Technical University of Lodz*, 50(1):67, 2001.
- [118] **Gutarowska B.** Metabolic activity of moulds as a factor of building materials biodegradation. *Polish Journal of Microbiology*, 59(2):119–124, 2010.
- [119] **Gutarowska B. et Czyzowska A.** The ability of filamentous fungi to produce acids on indoor building materials. *Annals of Microbiology*, 59(4):807–813, 2009.
- [120] **Gutarowska B. et Piotrowska M.** Methods of mycological analysis in buildings. *Building and Environment*, 42(4):1843–1850, avr. 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036013230600062X>.
- [121] **Herrmann J. M.** Heterogeneous photocatalysis : state of the art and present applications in honor of pr. R.L. burwell jr. (1912–2003), former head of ipatieff laboratories, northwestern university, evanston (Ill). *Topics in Catalysis*, 34(1):49–65, 2005. URL <http://www.springerlink.com/content/r568244056v87451/abstract/>.
- [122] **Hippelein M. et Rügamer M.** Ergosterol as an indicator of mould growth on building materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207(4):379–385, 2004. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463904703004>.
- [123] **Hoang C. P., Kinney K. A., Corsi R. L., et Szaniszlo P. J.** Resistance of green building materials to fungal growth. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(2):104–113, mars 2010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483050900198X>.
- [124] **Hérisson J., Hullebusch E. van, Guegen-Minerbe M., et Chaussadent T.** Biogenic corrosion mechanism : study of parameters explaining calcium aluminate cement durability. In **Fentiman C., R. M., et K. S.**, édés : *Proceedings of the International Conference of Calcium Aluminate*, p. 633–644, Avignon, France, 2014.
- [125] **Hüsken G., Hunger M., et Brouwers H. J. H.** Experimental study of photocatalytic concrete products for air purification. *Building and Environment*, 44(12):2463–2474, 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360132309001152>.
- [126] **Hu C., Guo J., Qu J., et Hu X.** Photocatalytic Degradation of Pathogenic Bacteria with AgI/TiO₂ under Visible Light Irradiation. *Langmuir*, 23(9):4982–4987, 2007. URL <http://dx.doi.org/10.1021/la063626x>.
- [127] **Huang Z., Maness P.-C., Blake D. M., Wolfrum E. J., Smolinski S. L., et Jacoby W. A.** Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 130(2–3):163–170, jan. 2000. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603099002051>.

- [128] **Hyvärinen A., Meklin T., Vepsäläinen A., et Nevalainen A.** Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials — concentrations and diversity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49(1):27–37, jan. 2002. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830501001032>.
- [129] **IEA** . Condensation and Energy : Sourcebook ; report annex XIV, chap 2 : Mould, mars 1991.
- [130] **Imlay J. A. et Linn S.** Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 166(2):519–527, mai 1986. URL <http://jb.asm.org/content/166/2/519>.
- [131] **Ireland J. C., Klostermann P., Rice E. W., et Clark R. M.** Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5):1668–1670, mai 1993. URL <http://aem.asm.org/content/59/5/1668>.
- [132] **Isaacs C. E., Litov R. E., et Thormar H.** Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6(7):362–366, 1995. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095528639580003U>.
- [133] **Isaksson T., Thelandersson S., Ekstrand-Tobin A., et Johansson P.** Critical conditions for onset of mould growth under varying climate conditions. *Building and Environment*, 45(7):1712–1721, 2010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360132310000351>.
- [134] **Ishiguro H., Nakano R., Yao Y., Kajioka J., Fujishima A., Sunada K., Minoshima M., Hashimoto K., et Kubota Y.** Photocatalytic inactivation of bacteriophages by TiO₂-coated glass plates under low-intensity, long-wavelength UV irradiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(11):1825, 2011. URL <https://pubs-rsc-org.docadis.ups-tlse.fr/en/content/articlelanding/2011/pp/c1pp05192j>.
- [135] **ISO 27447** . Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) - test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials, juin 2009.
- [136] **JIS Z 2801** . Antibacterial products - test for antibacterial activity and efficacy, 2010.
- [137] **Joanne Gamage et Zisheng Zhang** . Applications of Photocatalytic Disinfection. *International Journal of Photoenergy*, 2010, 2010.
- [138] **Johansson P., Ekstrand-Tobin A., Svensson T., et Bok G.** Laboratory study to determine the critical moisture level for mould growth on building materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 73:23–32, sept. 2012. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830512001230>.
- [139] **Johansson P., Samuelson I., Ekstrand-Tobin A., Mjörnell K., Sandberg P. I., et Sikander E.** Microbiological growth on building materials - critical moisture levels. state of the art. 2005.
- [140] **Johansson P., Svensson T., et Ekstrand-Tobin A.** Validation of critical moisture conditions for mould growth on building materials. *Building and Environment*, 62:201–209, avr. 2013. URL <https://www.sciencedirect-com.docadis.ups-tlse.fr/science/article/pii/S0360132313000267>.
- [141] **Kabara J. J., Vrable R., et Jie M. S. F. L. K.** Antimicrobial lipids : Natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids*, 12(9):753–759, sept. 1977. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02570908>.

- [142] **Kabara J. J., Swieczkowski D. M., Conley A. J., et Truant J. P.** Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(1):23–28, juil. 1972. URL <http://aac.asm.org/content/2/1/23>.
- [143] **Karunasena E., Markham N., Brasel T., Cooley J. D., et Straus D. C.** Evaluation of fungal growth on cellulose-containing and inorganic ceiling tile. *Mycopathologia*, 150(2):91–95, mai 2001. URL <http://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1010920611811>.
- [144] **Kato A. et Arima K.** Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on the growth of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 42(4):596–601, 1971. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X71905298>.
- [145] **Katsikogianni M. et Missirlis Y.** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*, 8:37–57, 2004.
- [146] **Kenny J. G., Ward D., Josefsson E., Jonsson I.-M., Hinds J., Rees H. H., Lindsay J. A., Tarkowski A., et Horsburgh M. J.** The *Staphylococcus aureus* Response to Unsaturated Long Chain Free Fatty Acids : Survival Mechanisms and Virulence Implications. *PLoS ONE*, 4(2):e4344, 2009. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004344>.
- [147] **Khalilzadeh P., Lajoie B., El Hage S., Furiga A., Baziard G., Berge M., et Roques C.** Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by an N-butanoyl-L-homoserine lactone analog. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(4):317–325, 2010. URL <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w10-013>.
- [148] **Kikuchi Y., Sunada K., Iyoda T., Hashimoto K., et Fujishima A.** Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films : dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 106(1–3):51–56, 1997. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603097000385>.
- [149] **Kim B., Kim D., Cho D., et Cho S.** Bactericidal effect of TiO₂ photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere*, 52(1):277–281, 2003. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653503000511>.
- [150] **Knapp H. R. et Melly M. A.** Bactericidal Effects of Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Infectious Diseases*, 154(1):84–94, juil. 1986. URL <http://jid.oxfordjournals.org/content/154/1/84>.
- [151] **Kočí K., Obalová L., Matějová L., Plachá D., Lacný Z., Jirkovský J., et Šolcová O.** Effect of TiO₂ particle size on the photocatalytic reduction of CO₂. *Applied Catalysis B : Environmental*, 89(3–4):494–502, juil. 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337309000113>.
- [152] **Kodicek E. et Worden A. N.** The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms. *Biochemical Journal*, 39(1):78–85, 1945. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1258155/>.
- [153] **Koseoglu S.** Glycerol production and utilization. *Practical Short Courses on Biodiesel : Market, Trends, Chemistry and Production*, 2006.
- [154] **Lackhoff M., Prieto X., Nestle N., Dehn F., et Niessner R.** Photocatalytic activity of semiconductor-modified cement—influence of semiconductor type and cement ageing. *Applied Catalysis B : Environmental*, 43(3):205–216, 2003. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092633730200303X>.

- [155] **Lappalainen S., Kärki E., R. hkönen, Loikkanen P., Palomäki E., Lindroos O., et Reijula K.** Evaluation of priorities for repairing in moisture-damaged school buildings in finland. *Building and Environment*, 36(8):981–986, oct. 2001. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360132300000822>.
- [156] **Lavigne M. P., Bertron A., Auer L., Hernandez-Raquet G., Foussard J.-N., Escadeillas G., Cockx A., et Paul E.** An innovative approach to reproduce the biodeterioration of industrial cementitious products in a sewer environment. part i : Test design. *Cement and Concrete Research*, 73:246 – 256, 2015. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000888461400252X>.
- [157] **Lawton M. D., Dales R. E., et White J.** The influence of house characteristics in a canadian community on microbiological contamination. *Indoor Air*, 8(1):2–11, 1998. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.1998.t01-3-00002.x/abstract>.
- [158] **Leclerc H., Gaillard J.-L., et Simonet M.** *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien*. Doin, 1995. ISBN 9782704007400.
- [159] **Legrini O., Oliveros E., et Braun A. M.** Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, 93(2):671–698, mars 1993. URL <http://dx.doi.org/10.1021/cr00018a003>.
- [160] **Leong S., Hocking A., et Scott E.** Effects of water activity and temperature on the survival of aspergillus carbonarius spores in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 42(4):326–330, 2006. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2006.01871.x/abstract>.
- [161] **Li C.-S., Hsu C.-W., et Tai M.-L.** Indoor pollution and sick building syndrome symptoms among workers in day-care centers. *Archives of Environmental Health : An International Journal*, 52(3):200–207, 1997. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00039899709602887>.
- [162] **Li D.-W. et Yang C. S.** Fungal contamination as a major contributor to sick building syndrome. *Advances in Applied Microbiology*, 55:31 – 112, 2004. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216404550025>.
- [163] **Li Y., Ma M., Wang X., et Wang X.** Inactivated properties of activated carbon-supported TiO₂ nanoparticles for bacteria and kinetic study. *Journal of Environmental Sciences*, 20(12):1527–1533, 2008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074208625619>.
- [164] **Linsebigler A. L., Lu G., et Yates J. T.** Photocatalysis on TiO₂ surfaces : Principles, mechanisms, and selected results. *Chemical Reviews*, 95(3):735–758, 1995. URL <http://dx.doi.org/10.1021/cr00035a013>.
- [165] **Liou J.-W. et Chang H.-H.** Bactericidal effects and mechanisms of visible light-responsive titanium dioxide photocatalysts on pathogenic bacteria. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 60(4):267–275, août 2012. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/s00005-012-0178-x>.
- [166] **Liu L.-f., John B., Yeung K. L., et Si G.** Non-UV based germicidal activity of metal-doped TiO₂ coating on solid surfaces. *Journal of Environmental Sciences*, 19(6):745–750, 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074207601247>.
- [167] **Lu Z.-X., Zhou L., Zhang Z.-L., Shi W.-L., Xie Z.-X., Xie H.-Y., Pang D.-W., et Shen P.** Cell damage induced by photocatalysis of tio₂ thin films. *Langmuir*, 19(21):8765–8768, oct. 2003. URL <http://dx.doi.org/10.1021/la034807r>.

- [168] **Lugauskas A., Levinskaite L., et Pečiulyte D.** Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(4):233–242, déc. 2003. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830503001100>.
- [169] **Luo L., Miao L., Tanemura S., et Tanemura M.** Photocatalytic sterilization of TiO₂ films coated on Al fiber. *Materials Science and Engineering : B*, 148(1–3):183–186, 2008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921510707004965>.
- [170] **Lydakis-Simantiris N., Riga D., Katsivela E., Mantzavinos D., et Xekoukoulotakis N. P.** Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO₂ photocatalysis. *Desalination*, 250(1):351–355, jan. 2010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001191640901087X>.
- [171] **Madsen A. M., Kruse P., et Schneider T.** Characterization of microbial particle release from biomass and building material surfaces for inhalation exposure risk assessment. *Annals of Occupational Hygiene*, 50(2):175–187, déc. 2005. URL <http://annhyg.oxfordjournals.org/content/50/2/175>.
- [172] **Maness P.-C., Smolinski S., Blake D. M., Huang Z., Wolfrum E. J., et Jacoby W. A.** Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction : toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9):4094–4098, sept. 1999. URL <http://aem.asm.org/content/65/9/4094>.
- [173] **Mariat F. et Adan-Campos C.** La technique du carré de tapis, méthode simple de prélèvement dans les mycoses superficielles. *Annales de l'Institut Pasteur*, 113(4):666–668, oct. 1967.
- [174] **Martinez T., Aouba L., Simon V., Bertron A., Coutand M., Escadeillas G., et Ringot E.** Air purification and emission of voc in air by photocatalytic tio₂-bearing coatings applied on mortars. 2011.
- [175] **Martinez T.** *Revêtements photocatalytiques pour les matériaux de construction : formulation, évaluation de l'efficacité de la dépollution de l'air et écotoxicité*. Thèse en génie civil, Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, 2012.
- [176] **Martinez T., Bertron A., Escadeillas G., et Ringot E.** Algal growth inhibition on cement mortar : Efficiency of water repellent and photocatalytic treatments under uv/vis illumination. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89:115–125, april 2014. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483051400033X>.
- [177] **Martinez T., Bertron A., Ringot E., et Escadeillas G.** Degradation of NO using photocatalytic coatings applied to different substrates. *Building and Environment*, 46(9):1808–1816, sept. 2011. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360132311000722>.
- [178] **Marugán J., Grieken R. van, Sordo C., et Cruz C.** Kinetics of the photocatalytic disinfection of Escherichia coli suspensions. *Applied Catalysis B : Environmental*, 82(1–2):27–36, 2008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337308000052>.
- [179] **Matsunaga T., Tomoda R., Nakajima T., Nakamura N., et Komine T.** Continuous-sterilization system that uses photoconductor powders. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6):1330–1333, juin 1988. URL <http://aem.asm.org/content/54/6/1330>.
- [180] **Matsunaga T., Tomoda R., Nakajima T., et Wake H.** Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*, 29(1-2):211 – 214, 1985. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378109785903003>.

- [181] **Méheust D.**. *Exposition aux moisissures en environnement intérieur : Méthode de mesure et Impacts sur la santé*. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, Rennes, nov. 2012. URL <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00768444>.
- [182] **Mendell M. J., Mirer A. G., Cheung K., Tong M., et Douwes J.**. Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents : a review of the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect*, 119(6):748–56, 2011.
- [183] **Midgley D. J., Saleeba J. A., Stewart M. I., Simpson A. E., et McGee P. A.**. Molecular diversity of soil basidiomycete communities in northern-central new south wales, australia. *Mycological Research*, 111(3):370–378, mars 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756207000226>.
- [184] **Miller J. D.**. Mycological investigation of indoor environments. In *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments : Diversity, Health Impacts, Investigation and Control*, p. 330–353. Taylor & Francis Group, London and New York, 2001.
- [185] **Miller J., Laflamme A., Sobol Y., Lafontaine P., et Greenhalgh R.**. Fungi and fungal products in some canadian houses. *International Biodeterioration*, 24(2):103–120, 1988. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/026530368890053X>.
- [186] **Miller R. D., Brown K. E., et Morse S. A.**. Inhibitory Action of Fatty Acids on the Growth of Neisseria gonorrhoeae. *Infection and Immunity*, 17(2):303–312, août 1977. URL <http://iai.asm.org/content/17/2/303>.
- [187] **Mills A. et Le Hunte S.**. An overview of semiconductor photocatalysis. *Journal of photochemistry and photobiology. A, Chemistry*, 108(1):1–35, 1997. URL <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2852970>.
- [188] **Mitoraj D., Jańczyk A., Strus M., Kisch H., Stochel G., Heczko P. B., et Macyk W.**. Visible light inactivation of bacteria and fungi by modified titanium dioxide. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(6):642, 2007. URL <https://pubs-rsc-org.docadis.ups-tlse.fr/en/content/articlelanding/2007/pp/b617043a>.
- [189] **Montana State University** . Center for Biofilm Engineering, 2015. URL <http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics.html>.
- [190] **Moreau C., Vergès-Belmin V., Leroux L., Oriol G., Fronteau G., et Barbin V.**. Water-repellent and biocide treatments : Assessment of the potential combinations. *Journal of Cultural Heritage*, 9(4):394 – 400, 2008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1296207408001210>.
- [191] **Mudarri D. et Fisk W. J.**. Public health and economic impact of dampness and mold. *Indoor Air*, 17(3):226–235, 2007. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.2007.00474.x/abstract>.
- [192] **Mugnier J. et Jung G.**. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(1):108–114, juil. 1985. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC238580/>.
- [193] **Mungkalasiri J., Bedel L., Emieux F., Cara A. V.-D., Freney J., Maury F., et Renaud F. N. R.**. Antibacterial properties of TiO₂-Cu composite thin films grown by a one step DLICVD process. *Surface and Coatings Technology*, 242:187–194, mars 2014. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897213008165>.

- [194] Mungkalasiri J., Bedel L., Emieux F., Doré J., Renaud F. N. R., Sarantopoulos C., et Maury F.. CVD Elaboration of Nanostructured TiO₂-Ag Thin Films with Efficient Antibacterial Properties. *Chemical Vapor Deposition*, 16(1-3):35–41, mars 2010. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cvde.200906764/abstract>.
- [195] Muranyi P., Schraml C., et Wunderlich J.. Antimicrobial efficiency of titanium dioxide-coated surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6):1966–1973, 2010. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04594.x/abstract>.
- [196] Murray A. E., Hollibaugh J. T., et Orrego C.. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two california estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7):2676–2680, juil. 1996. URL <http://aem.asm.org/content/62/7/2676>.
- [197] Murtoniemi T., Hirvonen M.-R., Nevalainen A., et Suutari M.. The relation between growth of four microbes on six different plasterboards and biological activity of spores. *Indoor Air*, 13(1):65–73, 2003. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0668.2003.01126.x/abstract>.
- [198] Muyzer G., Waal E. C. d., et Uitterlinden A. G.. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3):695–700, mars 1993. URL <http://aem.asm.org/content/59/3/695>.
- [199] Nadtochenko V., Denisov N., Sarkisov O., Gummy D., Pulgarin C., et Kiwi J.. Laser kinetic spectroscopy of the interfacial charge transfer between membrane cell walls of e. coli and TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 181(2–3):401–407, 2006. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603005006453>.
- [200] Nadtochenko V. A., Sarkisov O. M., Nikandrov V. V., Chubukov P. A., et Denisov N. N.. Inactivation of pathogenic microorganisms in the photocatalytic process on nanosized TiO₂ crystals. *Russian Journal of Physical Chemistry B, Focus on Physics*, 2(1):105–114, fév. 2008. URL <http://link.springer.com/article/10.1134/S1990793108010168>.
- [201] NF EN 1040 . Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques, avr. 2006.
- [202] NF EN ISO 846 . Plastiques. evaluation de l'action des micro-organismes, 1997.
- [203] Nielsen K., Hansen M., Larsen T., et Thrane U.. Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in danish buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 42(1):1–7, 1998. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830598000353>.
- [204] Nielsen K., Holm G., Uttrup L., et Nielsen P.. Mould growth on building materials under low water activities. influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(4):325–336, déc. 2004. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830504000782>.
- [205] Nielsen K., Thrane U., Larsen T., Nielsen P., et Gravesen S.. Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 42(1):9–16, 1998. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830598000389>.

- [206] **Nielsen K. F.** et **Madsen J. r. O. g.**. Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 898(2):227–234, nov. 2000. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300008736>.
- [207] **Nieminen S. M.**, **Kärki R.**, **Auriola S.**, **Toivola M.**, **Laatsch H.**, **Laatikainen R.**, **Hyvärinen A.**, et **Wright A. v.**. Isolation and identification of aspergillus fumigatus mycotoxins on growth medium and some building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10):4871–4875, oct. 2002. URL <http://aem.asm.org/content/68/10/4871>.
- [208] **Nolard N.** et **Beguín H.**. Moisissures. *Traité d’Allergologie, Paris, Médecine-Sciences, Flammarion*, p. 441–461, 2003.
- [209] **Nout M. J. R.**, **Laarhoven T. M. G. B.-v.**, **Jongh P. d.**, et **Koster P. G. d.**. Ergosterol content of rhizopus oligosporus NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(5):456–461, août 1987. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00253532>.
- [210] **Nu Hoai Nguyen V.**, **Amal R.**, et **Beydoun D.**. Photocatalytic reduction of selenium ions using different TiO₂ photocatalysts. *Chemical Engineering Science*, 60(21):5759–5769, nov. 2005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250905004112>.
- [211] **Nugari M.** et **Pietrini A.**. Trevi fountain : An evaluation of inhibition effect of water-repellents on cyanobacteria and algae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40(2–4):247 – 253, 1997. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830597000462>.
- [212] **Ohno T.**, **Sarukawa K.**, **Tokieda K.**, et **Matsumura M.**. Morphology of a TiO₂ photocatalyst (degussa, p-25) consisting of anatase and rutile crystalline phases. *Journal of Catalysis*, 203(1):82–86, oct. 2001. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021951701933160>.
- [213] **Ohno T.**, **Tokieda K.**, **Higashida S.**, et **Matsumura M.**. Synergism between rutile and anatase TiO₂ particles in photocatalytic oxidation of naphthalene. *Applied Catalysis A : General*, 244(2):383–391, 2003. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X02006105>.
- [214] **Özyildiz F.**, **Uzel A.**, **Hazar A. S.**, **Güden M.**, **Ölmez S.**, **Aras I.**, et **Karaboz İ.**. Photocatalytic antimicrobial effect of tio₂ anatase thin-film-coated orthodontic arch wires on 3 oral pathogens. *Turkish Journal of Biology*, p. 38, 2014.
- [215] **Pablos C.**, **Grieken R. van**, **Marugán J.**, et **Moreno B.**. Photocatalytic inactivation of bacteria in a fixed-bed reactor : Mechanistic insights by epifluorescence microscopy. *Catalysis Today*, 161(1):133–139, mars 2011. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586110006851>.
- [216] **Pal A.**, **Min X.**, **Yu L. E.**, **Pehkonen S. O.**, et **Ray M. B.**. Photocatalytic inactivation of bioaerosols by TiO₂ coated membrane. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 3(1), jan. 2005.
- [217] **Pal A.**, **Pehkonen S. O.**, **Yu L. E.**, et **Ray M. B.**. Photocatalytic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 186(2–3):335–341, fév. 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603006004746>.

- [218] **Parat S., Perdrix A., Mann S., et Cochet C.** A study of the relationship between airborne microbiological concentrations and symptoms in office in buildings. *In Healthy Buildings*, p. 1481–1486, Milan, sept. 1995.
- [219] **Parra R. et Magan N.** Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2):429–438, 2004. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2004.02320.x/abstract>.
- [220] **Pasanen A.-L.** A review : Fungal exposure assessment in indoor environments. *Indoor Air*, 11(2):87–98, 2001. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0668.2001.110203.x/abstract>.
- [221] **Pasanen A. L., Heinonen-Tanski H., Kalliokoski P., et Jantunen M. J.** Fungal microcolonies on indoor surfaces — an explanation for the base-level fungal spore counts in indoor air. *Atmospheric Environment. Part B. Urban Atmosphere*, 26(1):117–120, mars 1992. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/095712729290043R>.
- [222] **Pasanen A. L., Juutinen T., Jantunen M. J., et Kalliokoski P.** Occurrence and moisture requirements of microbial growth in building materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 30(4):273–283, 1992. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096483059290033K>.
- [223] **Pasanen A. L., Kalliokoski P., Pasanen P., Jantunen M. J., et Nevalainen A.** Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity. *Environment International*, 17(4):225–228, 1991. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016041209190006C>.
- [224] **Pasanen A.-L., Rautiala S., Kasanen J.-P., Raunio P., Rantamäki J., et Kalliokoski P.** The relationship between measured moisture conditions and fungal concentrations in water-damaged building materials. *Indoor Air*, 10(2):111–120, 2000. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0668.2000.010002111.x/abstract>.
- [225] **Pasanen A.-L., Kujanpää L., Pasanen P., Kalliokoski P., et Blomquist G.** Culturable and total fungi in dust accumulated in air ducts in single-family houses. *Indoor Air*, 7(2):121–127, 1997. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.1997.t01-2-00006.x/abstract>.
- [226] **Pasanen A.-L., Yli-Pietilä K., Pasanen P., Kalliokoski P., et Tarhanen J.** Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1):138–142, jan. 1999. URL <http://aem.asm.org/content/65/1/138>.
- [227] **Peat J. K., Dickerson J., et Li J.** Effects of damp and mould in the home on respiratory health : a review of the literature. *Allergy*, 53(2):120–128, fév. 1998.
- [228] **Peltola J., Andersson M. A., Haahtela T., Mussalo-Rauhamaa H., Rainey F. A., Kropenstedt R. M., Samson R. A., et Salkinoja-Salonen M. S.** Toxic-metabolite-producing bacteria and fungus in an indoor environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7):3269–3274, juil. 2001. URL <http://aem.asm.org/content/67/7/3269>.
- [229] **Perfil'ev B. V., Gabe D. R., et Vasil'evich B., Perfil'ev.** *Capillary Methods of Investigating Micro-Organisms*. University of Toronto Press, 1969. ISBN 9780802016249.

- [230] **Pestka J. J., Yike I., Dearborn D. G., Ward M. D. W., et Harkema J. R.** Stachybotrys chartarum, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness : New insights into a public health enigma. *Toxicological Sciences*, 104(1):4–26, juil. 2008. URL <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/104/1/4>.
- [231] **Pineau L., Roques C., Luc J., et Michel G.** Automatic washer disinfectors for flexible endoscopes : a new evaluation process. *Endoscopy*, 29(5):372–379, juin 1997. URL <http://europepmc.org/abstract/med/9270918>.
- [232] **Pitt J. I. et Christian J. H. B.** Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Applied Microbiology*, 16(12):1853–1858, jan. 1968. URL <http://aem.asm.org/content/16/12/1853>.
- [233] **Portnoy J. M., Barnes C. S., et Kennedy K.** Sampling for indoor fungi. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2):189–198, fév. 2004. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674903026836>.
- [234] **Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., Willey J. M., Sherwood L. M., et Woolverton C. J.** *Microbiologie*. De Boeck Supérieur, avr. 2010. ISBN 9782804160128.
- [235] **Preston A., Mandrell R. E., Gibson B. W., et Apicella M. A.** The Lipooligosaccharides of Pathogenic Gram-Negative Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 22(3):139–180, jan. 1996. URL <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10408419609106458>.
- [236] **Raw G., Aizlewood C., et Warren P.**, édés. *Indoor Air 99 : proceedings of the 8th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, held in Edinburgh, Scotland, 8-13 August 1999*, 1999. Construction Research Communications Ltd. ISBN 1860812953 9781860812958.
- [237] **Reboux G., Bellanger A.-P., Roussel S., Grenouillet F., et Millon L.** Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Revue Française d'Allergologie*, 50(8):611–620, déc. 2010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877032010001235>.
- [238] **Reboux G., Bellanger A. P., Roussel S., Grenouillet F., Sornin S., Piarroux R., Dalphin J. C., et Millon L.** Indoor mold concentration in eastern france. *Indoor Air*, 19(6):446–453, 2009. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.2009.00598.x/abstract>.
- [239] **Růžička J., Velclová K., Janiš R., et Krejčí J.** Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *European Food Research and Technology*, 217(4):329–331, oct. 2003. URL <http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-003-0764-6>.
- [240] **Rincón A.-G. et Pulgarin C.** Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on e. coli k12 photocatalytic inactivation by TiO₂ : implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B : Environmental*, 51(4):283–302, 2004. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337304001663>.
- [241] **Rincón A.-G. et Pulgarin C.** Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO₂ photo-assisted treatment of mixed E. coli and Bacillus sp. and bacterial community present in wastewater. *Catalysis Today*, 101(3–4):331–344, 2005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092058610500057X>.
- [242] **Rintala H., Nevalainen A., et Suutari M.** Diversity of streptomycetes in water-damaged building materials based on 16S rDNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 34(6):439–443, 2002. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.2002.01120.x/abstract>.

- [243] **Robertson P. K. J., Robertson J. M. C., et Bahnemann D. W.**. Removal of microorganisms and their chemical metabolites from water using semiconductor photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 211–212:161–171, 2012. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389411014385>.
- [244] **Rose L., Jensen B., Peterson A., Banerjee S. N., et Srduino M. J.**. Swab materials and bacillus anthracis spore recovery from nonporous surfaces. *Emerging infectious diseases*, 10(6):1023–1029, juin 2004.
- [245] **Ruot B., Plassais A., Olive F., Laurent Guillot , et Bonafous L.**. TiO₂-containing cement pastes and mortars : Measurements of the photocatalytic efficiency using a rhodamine B-based colourimetric test. *Solar Energy*, 83(10):1794 – 1801, 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038092X0900139X>.
- [246] **Russell A.**. Bacterial resistance to disinfectants : present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*, 43, Supplement 1(0):S57–S68, 1999. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019567019990066X>.
- [247] **Rylander R.**. Microbial cell wall constituents in indoor air and their relation to disease. *Indoor Air*, 8(S4):59–65, 1998. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0668.1998.tb00010.x/abstract>.
- [248] **Sage D.**. Color Segmentation : Imagej plugin to cluster color pixel driven by the user input., 2008. URL <http://bigwww.epfl.ch/sage/soft/colorsegmentation/>.
- [249] **Saito H., Tomioka H., et Yoneyama T.**. Growth of group IV mycobacteria on medium containing various saturated and unsaturated fatty acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(2):164–169, août 1984. URL <http://aac.asm.org/content/26/2/164>.
- [250] **Saito T., Iwase T., Horie J., et Morioka T.**. Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutans streptococci. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 14(4):369–379, juil. 1992. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/101113449285115B>.
- [251] **Samrakandi M. M., Roques C., et Michel G.**. Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production : bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(8):751–758, 1997. URL <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m97-108>.
- [252] **Samson R. A., Hoekstra E. S., et Frisvad J. C.**. *Introduction to food- and airborne fungi*. American Society for Microbiology, 7^e édn, 2004.
- [253] **Samson R. A., Horst M. I. v. d., et Staugaard P.**. Low temperature scanning electron microscopy of surface structures of the fungal cell wall. In **Latgé J. P. et Boucias D.**, édés : *Fungal Cell Wall and Immune Response*, num. 53 de NATO ASI Series, p. 1–10. Springer Berlin Heidelberg, 1991. ISBN 978-3-642-76076-1, 978-3-642-76074-7. URL http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-76074-7_1.
- [254] **Samson R., Flannigan B., Flannigan M., Verhoeff A., Adan O., et Hoekstra E.**, édés. *Health implications of fungi in indoor environments*. Elsevier, 1994. ISBN 0-444-81997-5.
- [255] **Santucci R., Meunier O., Ott M., Herrmann F., Freyd A., et Blay F.** de. Contamination fongique des habitations : bilan de 10 années d’analyses. *Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique*, 47(6):402–408, oct. 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0335745707001852>.

- [256] **Saraf A., Larsson L., Burge H., et Milton D.** Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry : comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a limulus amebocyte lysate assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7):2554–2559, juil. 1997. URL <http://aem.asm.org/content/63/7/2554>.
- [257] **Sautour M., Dantigny P., Divies C., et Bensoussan M.** A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1–2):63–69, 2001. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501004718>.
- [258] **Sayilkan F., Asiltürk M., Kiraz N., Burunkaya E., Arpaç E., et Sayilkan H.** Photocatalytic antibacterial performance of Sn⁴⁺-doped TiO₂ thin films on glass substrate. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2–3):1309–1316, mars 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389408008893>.
- [259] **Schnürer J.** Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2):552–555, fév. 1993. URL <http://aem.asm.org/content/59/2/552>.
- [260] **Scott W. J.** Water relations of food spoilage microorganisms. In **E.M. Mrak and G.F. Stewart**, éd. : *Advances in Food Research*, vol. Volume 7, p. 83–127. Academic Press, 1957. ISBN 0065-2628. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065262808602475>.
- [261] **Sedlbauer K.** Prediction of mould fungus formation on the surface of and inside building components, 2001.
- [262] **Sedlbauer K.** Prediction of mould growth by hygrothermal calculation. *Journal of Building Physics*, 25(4):321–336, avr. 2002. URL <http://jen.sagepub.com/content/25/4/321>.
- [263] **Seitz L. M., Sauer D., Burroughs R., Mohr H., et Hubbard J.** Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology*, 69(11):1202, 1979. URL <http://europemc.org/abstract/AGR/IND80001229/reload=0;jsessionid=7K1iI3TBVzUcNovcrHSv.18>.
- [264] **Seltzer J. M.** Building-related illnesses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 94(2, Part 2):351–361, 1994. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009167495400111X>.
- [265] **Sheu C. W. et Freese E.** Effects of Fatty Acids on Growth and Envelope Proteins of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 111(2):516–524, août 1972. URL <http://jb.asm.org/content/111/2/516>.
- [266] **Shibasaki I. et Kato N.** Combined effects on antibacterial activity of fatty acids and their esters against Gram negative bacteria. In **Kabara J. J.**, éd. : *The Pharmacological Effects of Lipids*, p. 15–24. The American Oil Chemists’ Society, 1978.
- [267] **Shirakawa M. A., Beech I. B., Tapper R., Cincotto M. A., et Gambale W.** The development of a method to evaluate bioreceptivity of indoor mortar plastering to fungal growth. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(2):83–92, mars 2003. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830501001299>.
- [268] **Shirakawa M., Selmo S., Cincotto M., Gaylarde C., Brazolin S., et Gambale W.** Susceptibility of phosphogypsum to fungal growth and the effect of various biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49(4):293–298, juin 2002. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830502000628>.

- [269] **Slippers B., Smit W. A., Crous P. W., Coutinho T. A., Wingfield B. D., et Wingfield M. J.** Taxonomy, phylogeny and identification of botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in south africa and other regions of the world. *Plant Pathology*, 56(1):128–139, 2007. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2006.01486.x/abstract>.
- [270] **Spengler J. D. et Chen Q.** Indoor air quality factors in designing a healthy building. *Annual Review of Energy and the Environment*, 25(1):567–600, 2000. URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.energy.25.1.567>.
- [271] **Squinazi F.** La pollution de l’air à l’intérieur des bâtiments (allergènes exclus). *Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique*, 42(3):248–255, avr. 2002. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0335745702001454>.
- [272] **Sunada K., Kikuchi Y., Hashimoto K., et Fujishima A.** Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. *Environmental Science & Technology*, 32(5):726–728, mars 1998. URL <http://dx.doi.org/10.1021/es970860o>.
- [273] **Sunada K., Watanabe T., et Hashimoto K.** Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 156(1–3):227–233, mars 2003. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603002004343>.
- [274] **Szponar B. et Larsson L.** Determination of microbial colonisation in water-damaged buildings using chemical marker analysis by gas chromatography – mass spectrometry. *Indoor Air*, 10(1):13–18, 2000. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0668.2000.010001013.x/abstract>.
- [275] **Taylor D. M.** *Transmissible degenerative encephalopathies : inactivation of the unconventional causal agents*, chap. 10, p. 324. John Wiley & Sons, 2008.
- [276] **Thelandersson S. et Isaksson T.** Mould resistance design (MRD) model for evaluation of risk for microbial growth under varying climate conditions. *Building and Environment*, 65:18–25, 2013. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360132313000966>.
- [277] **Thormar H., Isaacs C. E., Brown H. R., Barshatzky M. R., et Pessolano T.** Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(1):27–31, jan. 1987.
- [278] **Torvinen E., Meklin T., Torkko P., Suomalainen S., Reiman M., Katila M.-L., Paulin L., et Nevalainen A.** Mycobacteria and fungi in moisture-damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10):6822–6824, oct. 2006. URL <http://aem.asm.org/content/72/10/6822>.
- [279] **Torzilli A. P., Sikaroodi M., Chalkley D., et Gillevet P. M.** A comparison of fungal communities from four salt marsh plants using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). *Mycologia*, 98(5):690–698, sept. 2006. URL <http://www.mycologia.org/content/98/5/690>.
- [280] **Tran T. H., Govin A., Guyonnet R., Grosseau P., Lors C., Garcia-Diaz E., Damidot D., Devès O., et Ruot B.** Influence of the intrinsic characteristics of mortars on biofouling by *klebsormidium flaccidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70(0):31–39, mai 2012. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830512000479>.

- [281] **Tuomi T., Reijula K., Johnsson T., Hemminki K., Hintikka E.-L., Lindroos O., Kalso S., Koukila-Kähkölä P., Mussalo-Rauhamaa H., et Haahtela T.** Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5):1899–1904, mai 2000. URL <http://aem.asm.org/content/66/5/1899>.
- [282] **Tuomi T., Saarinen L., et Reijula K.** Detection of polar and macrocyclic trichothecene mycotoxins from indoor environments. *Analyst*, 123(9):1835–1842, jan. 1998. URL <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1998/an/a803813i>.
- [283] **Urzi C. et Leo F. D.** Evaluation of the efficiency of water-repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(1):25 – 34, 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830506001892>.
- [284] **Vacher S., Hernandez C., Bärtschi C., et Poussereau N.** Impact of paint and wall-paper on mould growth on plasterboards and aluminum. *Building and Environment*, 45(4):916–921, avr. 2010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360132309002546>.
- [285] **Valentin R., Alignan M., Giacinti G., Renaud F. N. R., Raymond B., et Mouloungui Z.** Pure short-chain glycerol fatty acid esters and glyceric cyclocarbonic fatty acid esters as surface active and antimicrobial coagels protecting surfaces by promoting superhydrophilicity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 365(1):280–288, jan. 2012. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979711011234>.
- [286] **Grieken R. van, Marugán J., Sordo C., et Pablos C.** Comparison of the photocatalytic disinfection of e. coli suspensions in slurry, wall and fixed-bed reactors. *Catalysis Today*, 144(1–2): 48–54, 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586108005749>.
- [287] **Van Oss C. J.** *Interfacial forces in aqueous media*. CRC press, 2006.
- [288] **Viitanen H., Vinha J., Salminen K., Ojanen T., Peuhkuri R., Paaajanen L., et Lähdesmäki K.** Moisture and bio-deterioration risk of building materials and structures. *Journal of Building Physics*, 33(3):201–224, jan. 2010. URL <http://jen.sagepub.com/content/33/3/201>.
- [289] **Von Bockelmann I. et Bockelmann B. von.** The sporocidal action of hydrogen peroxide, a literature review. *Lebensm Wissensch-Technol*, 5:221–225, 1972.
- [290] **Watanabe T., Fukayama S., Miyauchi M., Fujishima A., et Hashimoto K.** Photocatalytic Activity and Photo-Induced Wettability Conversion of TiO₂ Thin Film Prepared by Sol-Gel Process on a Soda-Lime Glass. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 19(1-3):71–76, déc. 2000. URL <http://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1008762121743>.
- [291] **Wei C., Lin W. Y., Zainal Z., Williams N. E., Zhu K., Kruzic A. P., Smith R. L., et Rajeshwar K.** Bactericidal activity of TiO₂ photocatalyst in aqueous media : Toward a solar-assisted water disinfection system. *Environmental Science & Technology*, 28(5):934–938, mai 1994. URL <https://pubs-acs-org.docadis.ups-tlse.fr/doi/abs/10.1021/es00054a027?prevSearch=bactericidal%2Bactivity%252C%2BWei%252C%2B1994&searchHistoryKey=>.
- [292] **White D. C., Bobbie R. J., Morrison S. J., Oosterhof D. K., Taylor C. W., et Meeter D. A.** Determination of microbial activity of estuarine detritus by relative rates of lipid biosynthesis. *Limnology and Oceanography*, 22(6):1089–1099, nov. 1977. URL <http://www.jstor.org/stable/2835183>.
- [293] **WHO** . Development of WHO guidelines for indoor air quality, 2006. URL <http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/>.

- [294] **WHO** . *WHO guidelines for indoor air quality : dampness and mould*. World Health Organization, 2009. URL http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/43325/E92645.pdf.
- [295] **WHO** . WHO guidelines for indoor air quality : selected pollutants, 2010. URL <http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/policy>.
- [296] **WHO** . WHO guidelines for indoor air quality : household fuel combustion, 2014. URL http://www.who.int/indoorair/guidelines/hhfc/IAQ_HHFC_guidelines.pdf?ua=1.
- [297] **Wiktor V., De Leo F., Urzi C., Guyonnet R., Grosseau P., et Garcia-Diaz E.** Accelerated laboratory test to study fungal biodeterioration of cementitious matrix. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(8):1061–1065, déc. 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830509001607>.
- [298] **Wiktor V., Grosseau P., Guyonnet R., Garcia-Diaz E., et Lors C.** Accelerated weathering of cementitious matrix for the development of an accelerated laboratory test of biodeterioration. *Materials and Structures*, 44(3):623–640, août 2010. URL <http://link.springer.com/article/10.1617/s11527-010-9653-1>.
- [299] **Wilimzig M. et Bock E.** Attack of mortar by bacteria and fungi. *Werkstoffe Und Korrosion-Materials and Corrosion*, 45(2):117–118, fév. 1994.
- [300] **Williamson I. J., Martin C. J., McGill G., Monie R. D., et Fennerty A. G.** Damp housing and asthma : a case-control study. *Thorax*, 52(3):229–234, mars 1997. URL <http://thorax.bmj.com/content/52/3/229>.
- [301] **Woese C. R., Kandler O., et Wheelis M. L.** Towards a natural system of organisms : proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12):4576–4579, juin 1990. URL <http://www.pnas.org/content/87/12/4576>.
- [302] **Wu P., Imlay J. A., et Shang J. K.** Mechanism of Escherichia coli inactivation on palladium-modified nitrogen-doped titanium dioxide. *Biomaterials*, 31(29):7526–7533, oct. 2010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210007957>.
- [303] **Wu P., Xie R., Imlay J. A., et Shang J. K.** Visible-light-induced photocatalytic inactivation of bacteria by composite photocatalysts of palladium oxide and nitrogen-doped titanium oxide. *Applied Catalysis B : Environmental*, 88(3–4):576–581, 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337308004700>.
- [304] **XP ENV 12404** . Durability of wood and wood-based products. assessment of the effectiveness of a masonry fungicide to prevent growth into wood of dry rot *serpula lacrymans* (schumacher ex fries) S.R gray. laboratory method, juil. 1997.
- [305] **XP ENV 807** . Wood preservatives - determination of the effectiveness against soft rotting micro-fungi and other soil inhabiting micro-organisms, déc. 2001.
- [306] **Yamaguchi N., Ishidoshiro A., Yoshida Y., Saika T., Senda S., et Nasu M.** Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *Journal of Microbiological Methods*, 53(3):405–410, 2002. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701202002464>.
- [307] **Yan G., Chen J., et Hua Z.** Roles of H₂O₂ and OH radical in bactericidal action of immobilized TiO₂ thin-film reactor : An ESR study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 207(2–3):153–159, sept. 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603009001129>.

- [308] **Yao K. S., Wang D. Y., Yan J. J., Yang L. Y., et Chen W. S.** Photocatalytic effects of TiO₂/Fe thin film irradiated with visible light on cellular surface ultrastructure and genomic DNA of bacteria. *Surface and Coatings Technology*, 201(15):6882–6885, 2007. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025789720601098X>.
- [309] **Yu J. C., Ho W., Lin J., Yip H., et Wong P. K.** Photocatalytic Activity, Antibacterial Effect, and Photoinduced Hydrophilicity of TiO₂ Films Coated on a Stainless Steel Substrate. *Environmental Science & Technology*, 37(10):2296–2301, 2003. URL <http://dx.doi.org/10.1021/es0259483>.
- [310] **Yu J. C., Xie Y., Tang H. Y., Zhang L., Chan H., et Zhao J.** Visible light-assisted bactericidal effect of metalphthalocyanine-sensitized titanium dioxide films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 156(1–3):235–241, mars 2003. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101060300300008X>.
- [311] **Zhang Y., Crittenden J. C., Hand D. W., et Perram D. L.** Fixed-bed photocatalysts for solar decontamination of water. *Environmental Science & Technology*, 28(3):435–442, mars 1994. URL <http://dx.doi.org/10.1021/es00052a015>.
- [312] **Zhang Z., Wang C.-C., Zakaria R., et Ying J. Y.** Role of particle size in nanocrystalline TiO₂-Based photocatalysts. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(52):10871–10878, déc. 1998. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp982948+>.

Table des figures

1.1	Arbre phylogénétique universel, adapté de Woese <i>et al.</i> (301).	18
1.2	Représentations schématiques des trois formes principales des bactéries.	19
1.3	Schéma d'une cellule procaryote, adapté de Leclerc <i>et al.</i> (158)	20
1.4	Schéma d'enveloppes bactériennes : (a) Gram +, (b) Gram -, adapté de Prescott <i>et al.</i> (234, chap. 3, p.57)	21
1.5	Schéma morphologique d'une cellule eucaryote	21
1.6	Schéma de formation d'un biofilm (189)	23
1.7	Méthodes d'échantillonnage utilisées dans les études sur matériaux de construction. Pourcentage sur 33 études.	27
1.8	Observation au microscope à épifluorescence (x40) de <i>Listeria monocytogenes</i> 10357 (A : cellule en phase stationnaire de croissance; B : Témoin de désinfection; C : Test de désinfection). DAPI : coloration de toutes les cellules, SYTOX : coloration des cellules mortes. (8).	31
1.9	Illustration de la morphologie typique des genres <i>Aspergillus</i> (a) et <i>Cladosporium</i> (b) (252).	31
1.10	Techniques d'inoculation utilisées en laboratoire, pour des essais sur matériaux de construction. Pourcentage du nombre d'utilisation sur 20 publications.	41
1.11	Schéma de principe de la photocatalyse.	51
1.12	Influence des différents paramètres physiques qui gouvernent la cinétique de la photocatalyse. Où r est le taux de réaction; (a) masse du catalyseur; (b) longueur d'onde; (c) concentration initiale du réactif; (d) température; (e) flux énergétique. (121)	53
1.13	Position des bandes d'énergie de différents semi-conducteurs (164)	54
1.14	Taux de dégradation obtenus sous différents illuminants pour les TiO_2 conventionnels ou dopés (C- TiO_2) dispersés dans de l'eau (76).	55
1.15	Taux de dégradation obtenus sous différents illuminants pour les TiO_2 conventionnels ou dopés (C- TiO_2) formulés en lasures (76).	56
1.16	Cinétique de survie de micro-organismes par photocatalyse de TiO_2 (169)	59
1.17	Schéma du mode d'attaque des radicaux sur une paroi bactérienne Gram -. Figure adaptée de (273). (1) attaque de la paroi cellulaire, (2) pénétration des espèces réactives à travers le peptidoglycane, et (3) attaque de la membrane plasmique.	61
1.18	Clichés MEB de cellules d' <i>E.coli</i> (a) non traitées; (b) et (c) après 2h de traitement photocatalytique, et (d) après 30min de traitement photocatalytique (302)	62
1.19	Evolution de l'inactivation d' <i>E. coli</i> en fonction de la concentration bactérienne initiale. Synthèse des travaux de (172; 179; 273)	63
1.20	Réaction d'estérification du glycérol : cas général et réaction avec acide undécylénique	66

1.21	Clichés au MET de l'effet de la monocaprine sur l'ultrastructure de streptocoques. A, C et E : cellules témoins avec membrane plasmique (PM), paroi cellulaire (CW) et granules cytoplasmiques (G) intacts ; B, D et F : cellules traitées avec 10 mM de monocaprine pendant 30 minutes, montrant la disparition de la membrane plasmique et des granules et quelques changements visibles sur la paroi cellulaire (24)	69
2.1	Vue d'ensemble des méthodes d'évaluation de la résistance aux micro-organismes utilisées dans ces travaux.	75
2.2	Analyse DRX (cathode Co) des dioxydes de titane commerciaux.	77
2.3	Clichés MEB d'une poudre de TiO_2 de chez Kronos diluée dans de l'eau, non dispersée chimiquement	78
2.4	Schéma d'estimation du pH d'une goutte d'inoculum au contact de la lasure LP_{psi}	79
2.5	Schéma de montage de l'étape de lixiviation des pâtes de ciment.	81
2.6	Gauche : Schéma de la boîte en borosilicate. Droite : Diagramme de suivi des conditions hygrométriques pendant un essai, à l'intérieur et à l'extérieur d'une boîte de Petri en borosilicate.	87
2.7	Schéma des configurations de l'essai d'inactivation en boîte de Petri.	87
2.8	Effet d'une irradiation UV sur la survie de cellules bactériennes <i>E.coli</i> , (135).	88
2.9	Effet d'une irradiation UV sur la survie de cellules bactériennes <i>E.coli</i> lors d'un essai en boîte de Petri, irradiance $\approx 2,5 \text{ W/m}^2$	89
2.10	Schéma de principe de la validation du protocole de filtration	90
2.11	Organigramme du protocole de test : Activité antibactérienne. Adapté de ISO 27447 (135)	91
2.12	Schéma de principe de l'essai cinétique d'inactivation bactérienne	92
2.13	Schéma de principe de l'essai cinétique d'inactivation bactérienne	93
2.14	Organigramme du protocole de test de bactéricidie. Eau PPI = Eau Pour Préparation Injectable	95
2.15	Photo des micro-plaques 6 puits avec échantillons utilisées pour l'essai Biofilm.	97
2.16	Schéma du protocole d'essai de résistance à la formation de biofilm	98
2.17	Exemple d'utilisation du module <i>Color Segmentation</i> pour déterminer le pourcentage de surface colonisée.	100
2.18	Schéma de la procédure réalisée pour mesurer les angles de contact en fonction du temps de pré-vieillessement des échantillons par une irradiation UV.	101
2.19	Synthèse des différents essais mis en place en fonction des matériaux.	102
2.20	Photographies au microscope optique (x100) de cellules après une coloration de Gram.	103
3.1	Nombre de bactéries comptées sur membranes après l'étape de filtration sur trois poudres de TiO_2 commerciales : Millenium PC500, Kronos vlp7000, Kronos vlp7050.	108
3.2	Photographie d'une couche de TiO_2 déposée par sédimentation et séchage à l'air ambiant.	109
3.3	Nombre d'UFC (log) de <i>E. coli</i> après 0h et 24h de contact à 25°C avec les trois poudres commerciales de TiO_2 dans le noir. Un essai par poudre, moyenne \pm es, n=3	109
3.4	Nombre d'UFC (log) de <i>B. pumilus</i> après 0h et 24h de contact à 25°C avec les trois poudres commerciales de TiO_2 dans le noir. Un essai par poudre, moyenne \pm es, n=3	110
3.5	Activité antibactérienne des différents TiO_2 dans le noir, après 24h de contact à 25°C (JIS Z 2801). Un test par poudre, moyenne \pm es, n=3	111
3.6	Nombre d'UFC en fonction du dosage en TiO_2 . Un test par concentration, moyenne \pm es, n=2.	113
3.7	Nombre d'UFC dénombrées au cours des premiers essais, de 2h, avec du TiO_2 déposé par sédimentation. Un test, moyenne \pm es, n=3.	114

3.8	Photographies au microscope optique ($\times 100$) d'une goutte de mélange d'essai (bactéries + TiO_2). Sur les images de gauche, on peut observer les plans sur lesquels dérivent les bactéries (plan de focalisation 1 sur le schéma). Ces plans sont différenciables, par changement de mise au point, des plans où le dioxyde de titane a sédimenté, visibles sur les photographies de droite (plan de focalisation 2).	116
3.9	Activité antibactérienne du TiO_2 sur E. coli à différents temps d'irradiation lumineuse ($2,5 \text{ W/m}^2$). A gauche, sans film ; à droite, avec un film réduisant la distance entre les bactéries et les particules. Un test indépendant réalisé par échéance. Moyenne \pm es, $n=3$. .	117
3.10	Rôles des DRO dans la destruction photocatalytique de bactéries. L'oxydation directe des composants cellulaires peut intervenir lorsque les cellules sont en contact direct avec le catalyseur. Les radicaux hydroxyles et H_2O_2 sont impliqués à courte et longue distances du catalyseur, respectivement (91)	118
3.11	Validation du protocole de neutralisation : les nombres d'UFC sur les échantillons filtrés et les échantillons non filtrés sont égaux.	120
3.12	Comparatif des activités antibactériennes entre deux méthodologies d'évaluation : En boîte de Petri VS en suspension sous agitation magnétique	121
3.13	Évolution du nombre d'UFC par ml en fonction de la nature de la suspension. Moyenne \pm es, $n=3$ (essais indépendants).	121
3.14	Schéma de deux modèles cinétiques d'inactivation bactérienne : (a) Chick-Watson (3.1), (b) Chick-Watson retardé (3.2)	122
4.1	Évolution de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur des échantillons revêtus de lasure photocatalytique et de lasure témoin, en fonction du temps de pré-vieillessement à la lumière UV. Moyenne \pm es, $6 < n < 12$. * : pas de mesure possible pour la pâte de ciment à 48h.	131
4.2	Clichés de l'évolution de la forme d'une goutte quelques secondes après le dépôt pour différents temps de pré-vieillessement.	131
4.3	Clichés MEB des échantillons de pâte de ciment (à gauche) et de membrane (à droite) recouverts de LP_{dis} . Grossissement $\times 50$ et $\times 500$ de haut en bas.	133
4.4	Cliché MEB en mode électrons secondaires des échantillons de pâte de ciment et cartographie EDX du titane	133
4.5	Évolution de l'angle de contact sur différents matériaux recouverts de lasure photocatalytique et recouverts de lasure témoins, sans titane, en fonction du temps de pré-vieillessement à la lumière UV. Moyenne \pm es, $6 < n < 12$	134
4.6	Photographies de deux profils morphologiques de gouttes formant des angles de contact substrat-eau très différents sur un même échantillon de mortier recouvert de LP_{dis} après 109h d'exposition aux UV.	134
4.7	Clichés MEB en mode électrons rétrodiffusés d'un même échantillon de mortier recouvert de LP_{psi} . L'aspect de la surface est très hétérogène. A gauche, une zone où le recouvrement par lasure n'a pas été satisfaisant, la surface semble accidentée et rugueuse. A droite, une zone recouverte de lasure, l'état de surface est plus favorable.	135
4.8	Activité antibactérienne de LP_{psi} , formulée à base de particules de TiO_2 et de silicates. L'échelle de droite indique l'activité relative par rapport à la concentration bactérienne sur témoin. Moyenne \pm es, $n=3$	137
4.9	Activité antibactérienne des premières lasures formulées sans silicate. Moyenne \pm es, $n=3$. .	138
4.10	Efficacité des lasures photocatalytiques (formulée avec de l'acrylique et des particules de TiO_2 sous forme de dispersion, LP_{dis} , ou sous forme pulvérulente LP_{p1}) sur l'abattement de NO_x et NO sous irradiation lumineuse	139

4.11	Activité antibactérienne de la lasure LP_{dis} , de la dispersion chimique VLP7454 (diluée à 5%) et des particules de TiO_2 seules (chap. 3), irradiées par une lumière UV. Moyenne \pm es, n=3.	141
4.12	Activité antibactérienne de la lasure LP_{dis} irradiée par des UV, selon de la concentration bactérienne de l'inoculum. Moyenne \pm se, n=3.	142
4.13	Activité antibactérienne de la lasure LP_{dis} sur <i>E. coli</i> après 4h de test, en fonction du temps de pré-vieillessement aux UV ($\approx 3 \text{ W/m}^2$). Moyenne \pm es, n=3. La courbe bleue représente les valeurs d'angles de contact mesurées sur les membranes aux échéances correspondantes (cf partie 4.2.1).	143
4.14	Schéma de principe de la libération des nanoparticules encapsulées. (a) Début du pré-vieillessement aux UV ; (b) une faible intensité d'UV atteint les nanoparticules proches de la surface et la réaction photocatalytique commence, la matrice liante se dégrade peu à peu autour des particules. (c) la dégradation de la matrice fait apparaître une porosité supplémentaire, qui augmentant l'accès des UV et facilite la diffusion des composés actifs (radicaux) vers l'extérieur ou des polluants (et micro-organismes) vers les particules. . . .	144
4.15	Nombre de cellules adhérentes viables sur les échantillons après 24h. Moyenne \pm es, n=9 (3 essais).	146
4.16	Clichés des différentes étapes de filtrage et seuillage des images obtenues au microscope à épifluorescence sur un échantillon recouvert de lasure témoin et maintenu dans le noir. . .	148
4.17	Clichés au microscope à épifluorescence des échantillons après 24h d'essai biofilm. Pour les échantillons LP_{dis} , les photographies ont été réalisées (I) au centre de l'échantillon et (II) en bordure de l'échantillon.	149
4.18	Clichés MEB (mode SE) des échantillons de pâte de ciment. (a) et (b) : recouverts de lasure témoin et conservés dans le noir ; (c) et (d) : recouverts de lasure témoin et exposés aux UV ; (e) et (f) : recouverts de LP_{dis} et conservés dans le noir.	152
4.19	Clichés MEB (mode SE) d'un échantillon recouvert de LP_{dis} et exposé aux UV pendant 24h d'essai. Les agrandissements, x50 (a), x500 (b), x2000 (c) et x5000 (d), permettent d'observer une substance bactérienne colonisant la lasure.	153
4.20	Clichés MEB (mode SE) de cellules intactes, retrouvées sur la lasure témoin (sans photocatalyseur) maintenue dans le noir, (a) et (b). Les clichés (c), (d) et (e) montrent des cellules bactériennes mortes à la surface d'un échantillon recouvert de lasure LP_{dis} et exposé aux UV pendant 24h. Les flèches rouges indiquent des potentiels agrégats de particules de TiO_2	154
4.21	Effet bactéricide du MG, calculé à partir des résultats du tableau 4.2 : $\log(N_0/N_a)$. Moyenne \pm es, n=4 (essais indépendants).	156
4.22	A gauche : schéma du dispositif de l'essai en boîte de Petri, permettant le maintien des conditions hygrométriques ($\approx 90\%HR$), à droite : Courbe de l'humidité relative maintenue au cours de l'essai.	157
4.23	Nombre d'UFC (\log_{10}) retrouvées après 24h de contact avec de MG testé. Moyenne \pm e.s., n=3. ND^* : Non détectée, aucune UFC n'a été trouvée après 24h pour la dilution la plus faible (10^{-1}).	158
4.24	Pourcentage de surface colonisée des échantillons en fonction du temps d'incubation, calculée à partir de l'analyse d'image. Moyenne \pm es, n =3.	159
4.25	Photographies des échantillons de placo colonisés après 0, 8 et 14 semaines de stockage en chambre humide (100%HR).	160

Liste des tableaux

1.1	Classification taxonomique et exemple de noms. Le domaine et la division sont également visibles sur la figure 1.1 précédente.	18
1.2	Tableau synthétique des différents types nutritionnels (158; 234)	23
1.3	Synthèse bibliographique des études utilisant le dosage de composants/composés chimiques pour estimer la contamination microbienne.	35
1.4	Bilan des micro-organismes identifiés le plus fréquemment en environnement intérieur. N.I. = Non identifié, "+" = gène trouvé en quantité supérieure à 10% sur le matériau correspondant.	38
1.5	Synthèse de différentes normes d'essais en laboratoire	40
1.6	Synthèse bibliographique des conditions d'essais de prolifération microbienne sur matériaux de construction. N.R. = Non Renseigné	43
1.7	<i>Fungi</i> se développant sur matériaux de construction et valeurs d'activité de l'eau a_w requise pour leur croissance (162)	45
1.8	Synthèse de valeurs d'irradiance généralement utilisées au cours d'essais d'abatement bactérien. Comparatif avec les valeurs d'irradiance mesurées en situation réelle en environnement extérieur (ext.), selon les conditions (cond.) d'ensoleillement, et intérieur (int.). . . .	57
2.1	Caractéristiques des poudres de TiO_2 commerciaux utilisés dans ces travaux, issus des fiches fournisseurs. Données issues des travaux de Nu Hoai Nguyen <i>et al.</i> (210)	76
2.2	Constitution de la première lasure LP_{psi}	79
2.3	Constitution de la lasure LP_{dis} , choisie pour la suite de cette étude.	79
2.4	Liste synthétique des lasures photocatalytiques utilisées au cours de ces travaux de thèse.	80
2.5	Composants des milieux de culture utilisés pour le dénombrement des UFC (TSA) et la préparation de spores de <i>B. Pumilus</i> (MYA). Conservation : 1 mois max à 4°C.	83
2.6	Composants des milieux liquides utilisés. Valeurs de masse sèche pour 1 l d'eau distillée stérile. Conservation : 1 mois max à 4°C.	84
2.7	Composition du Bouillon Biofilm Modifié. * À autoclaver séparément.	84
2.8	Nombre de cellules par ml des différents mélanges d'essai (201)	94
3.1	Tableau synthétique des quatre configurations lancées au cours de chaque test.	115
4.1	Tableau synthétique des quatre configurations lancées au cours de chaque test.	136
4.2	Nombre d'UFC retrouvées dans les différents échantillons (log10). Moyenne \pm es, n=4 (essais indépendants)	156

TITRE : Élaboration de revêtements pour matériaux de construction visant à lutter contre la prolifération microbienne à l'intérieur des bâtiments : efficacité et mode d'action.

RÉSUMÉ : Ces travaux s'appuient sur un contexte de santé lié à la dégradation de la qualité de l'air intérieur induite par la présence de micro-organismes. Dans les environnements intérieurs humides, les matériaux de construction sont des cibles de contamination et de prolifération microbienne importantes.

La photocatalyse est un procédé de dépollution qui présente une action contre une large gamme de polluants organiques (aqueux, gazeux ou biologiques). Son principe repose sur l'excitation d'un photocatalyseur par une irradiation lumineuse, généralement située dans les UV, qui va permettre de dégrader les polluants environnants par une succession de réactions d'oxydo-réduction. Le photocatalyseur le plus courant est le dioxyde de titane (TiO₂). Outre la production d'espèces oxydo-réductrices agressives, le TiO₂ illuminé présente également un caractère super-hydrophile qui lui confère un caractère autonettoyant intéressant.

Une autre solution est envisagée pour lutter contre la prolifération microbienne sur matériaux de construction : l'utilisation de molécule bio-sourcées d'ester de glycérol aux propriétés naturellement antimicrobienne. L'objectif de cette étude est de développer des revêtements pour matériaux de construction intérieurs et d'étudier leur propriété de résistance à la prolifération microbienne et les modes d'action de ces dispositifs passifs formulés soit à base de particules de TiO₂, soit à base d'ester de glycérol.

Dans un premier temps, un travail de développement et de mise en œuvre de dispositifs expérimentaux a été nécessaire afin d'adapter des méthodes d'évaluation microbiologiques sur ces matériaux particuliers (particules, lasures, matériaux cimentaires). Ainsi, plusieurs essais ont été adaptés afin d'évaluer les performances antimicrobiennes en terme (i) d'activité antibactérienne, (ii) d'effet bactéricide, (iii) de résistance à la formation de biofilm et (iv) de résistance à la prolifération par contamination "naturelle".

Les premiers essais visent à mettre en évidence l'impact des facteurs méthodologiques sur l'activité antibactérienne des particules de TiO₂ utilisées seules comme agent désinfectant. Dans un deuxième temps, des lasures photocatalytiques sont formulées sur la base de travaux antérieurs ayant montrés de bonnes efficacités de dépollution de l'air contre les NO_x, NO et différents COV. Une fois les paramètres d'influence de l'activité du TiO₂ mis en exergue, les lasures ont été testées dans des conditions optimales. Le développement d'un essai de résistance à la prolifération de biofilm montre l'importance de coupler différentes méthodes d'évaluation microbiologique (dénombrement des UFC et observation au microscope à épifluorescence).

La dernière partie de cette étude explore le potentiel antimicrobien de la molécule d'ester de glycérol, sous-produit de la synthèse de biocarburant. La molécule montre des propriétés antibactériennes et bactéricides puissantes en quelques minutes de contact seulement. Elle présente également une protection très efficace contre la prolifération microbienne une fois recouverte sur matériaux de construction (placo-plâtre). Ces performances remarquables encouragent la poursuite des études sur cette molécule.

MOTS CLEFS : Photocatalyse, Prolifération microbienne, Matériaux de construction, Revêtements antimicrobiens, Ester de glycérol.

TITLE : Development of coatings for indoor building materials in order to fight against microbial growth inside buildings : efficiency and mechanisms.

ABSTRACT : This work is included in a health-related context : the degradation of the indoor air quality induced by the presence of microorganisms. In damp environments, indoor building materials are among the main proliferation substrates for microorganisms.

Photocatalysis is a decontamination process which is active against a wide range of organic pollutants (aqueous, gaseous or biological). The principle is based on the excitation of a photocatalyst by light irradiation, usually located in the UV-range, which leads to the degradation or mineralization of surrounding pollutants through a series of oxidative reactions. The most common photocatalyst is titanium dioxide (TiO₂). In addition to produce aggressive redox species, the illuminated TiO₂ also shows super-hydrophilicity, which has an impact on the first step of microbial biofilm formation : the adhesion of microorganisms.

Another technology to protect indoor building materials is explored : the use of glycerol esters, which are bio-based molecules with inherent antimicrobial properties.

The main objective of this study is to develop semi-transparent coatings for indoor building materials and to study the resistance to microbial growth conferred by these passive devices, which are formulated using TiO₂ nanoparticles or glycerol esters.

Initially, the development and implementation of experimental devices has been necessary to adapt microbiological evaluation methods to these particular materials (nanoparticles, surface coatings, cementitious materials). Thus, several tests have been carried out in order to assess the antimicrobial performances in terms of (i) antibacterial activity, (ii) bactericidal effect, (iii) resistance to biofilm formation and (iv) resistance to proliferation by “natural” contamination. First tests aimed to underline the influence of methodological parameters on the efficiency of TiO₂ particles used alone as antimicrobial agent. Then, semi-transparent coatings were formulated on the basis of previous works which have shown good efficiencies on the depollution of ambient air from NO_x, NO and VOC. Once the parameters that influence TiO₂ activity were identified, coatings were tested in optimum conditions. The evaluation of the resistance to biofilm formation shows the importance of overlapping different microbiological evaluation methods (e.g. CFU counting and epifluorescence observations).

The last part was an exploratory work on the antimicrobial properties of a glycerol ester molecule, by-product from the synthesis of biofuels. The molecule shows potent antibacterial and bactericidal properties, several log of inactivation within only few minutes of contact. It also provides very effective protection against microbial growth once covered on building materials (plasterboard). These remarkable performances encourage further studies on this molecule.

KEY-WORDS : Photocatalyse, Prolifération microbienne, Matériaux de construction, Revêtements antimicrobiens, Ester de glycérol.